

UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DAS VORKOMMEN
IPN-VIRUSSUBTYPEN
(Ab, He, Sp)-SPEZIFISCHER
ANTIKÖRPER BEI SALMONIDEN
IN DER BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND

Gottfried Kohlmeyer



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554610_0071

Aus dem Institut für
Zoologie und Hydrobiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstände: Prof. Dr. M. Ruf und Prof. Dr. Dr. habil. R. Hoffmann

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. habil. W. Ahne

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VORKOMMEN
IPNV-VIRUSSUBTYPEN (AB, HE, SP)-SPEZIFISCHER
ANTIKÖRPER BEI SALMONIDEN
IN DER BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Gottfried Kohlmeyer
aus
Dinkelsbühl

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. Dr.habil. W. Ahne

Korreferent: Prof. Dr. D.O. Schmid

Tag der Promotion: 28. Februar 1986

Meinen Eltern

in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Schrifttum	
1. Allgemeines	2
2. Die infektiöse Pankreasnekrose (IPN)	3
2.1 Vorkommen und Verbreitung der infektiösen Pankreasnekrose (IPN)	3
2.2 Aufbau und Eigenschaften des IPNV	6
2.2.1 Aufbau	6
2.2.2 Eigenschaften	7
2.3 Krankheitsbild der IPN	9
2.4 Epizootiologie der IPN	9
2.4.1 Horizontale Virusübertragung	10
2.4.2 Vertikale Virusübertragung	10
2.5 Faktoren, die den Ausbruch eines IPNV-bedingten Seuchengeschehens beeinflussen	11
2.5.1 Wirtssystem	11
2.5.2 Umweltfaktoren	11
2.5.3 Virusfaktoren	12
2.6 Immunologie	14
2.7 Diagnose der IPN	15
2.8 IPNV-Bekämpfung	17
2.9 Serologische Nachweismethoden des IPNV	19
2.9.1 Der Neutralisationstest (NT)	19
2.9.2 Die Immunofluoreszenztechnik (IFT)	20
III. Eigene Untersuchungen	21
1. Material und Methoden	21
1.1 Untersuchungsmaterial	21
1.2 Zellkulturen	22
1.3 Virusstämme	23

	Seite
1.4 Virustitration	24
1.4.1 Mikrotitermethode	24
1.4.2 Plaquesmethode	24
1.5 Plaquesgrößenbestimmung	24
1.6 Virusisolierung	25
1.7 Virulenz der Virussubtypen IPNV Sp (5. Passage) IPNV Sp (11. Passage), IPNV Ab (3. Passage) und IPNV He (11. Passage)	25
1.8 Antiserenherstellung	26
1.8.1 Antigenaufbereitung	26
1.8.2 Immunisierung der Fische	26
1.9 Serologische Arbeitsmethoden	27
1.9.1 Neutralisationstest	27
1.9.2 Immunofluoreszenz	28
2. Ergebnisse	29
2.1 Virusidentifizierung	29
2.2 Biologische Eigenschaften der IPNV-Subtypen Sp, Ab, He	31
2.2.1 Plaquesgrößen	31
2.2.2 Virulenz	34
2.3 Die humorale Immunantwort der experimentell mit den IPNV-Subtypen Sp (5. Passage), Sp (11. Passage), Ab (3. Passage) und He (11. Passage) infizierten (i.p.) Regenbogenforellen (200 g)	39
2.3.1 IPNV-Subtyp Sp (5. Passage), IPNV-Subtyp Sp (11. Passage)	40
2.3.2 IPNV-Subtyp Ab (3. Passage)	41
2.3.3 IPNV-Subtyp He (11. Passage)	42
2.4 Nachweis von IPNV-Antikörpern in Regenbogen- forellenfeldseren aus Zuchtbetrieben mittels des Neutralisationstests	43
2.4.1 Antikörper gegenüber IPNV-Subtyp Sp (5. Passage)	43
2.4.2 Antikörper gegenüber IPNV-Subtyp Sp (11. Passage)	44
2.4.3 Antikörper gegenüber IPNV-Subtyp Ab (3. Passage)	45
2.4.4 Antikörper gegenüber IPNV-Subtyp He (11. Passage)	46
2.5 IPNV-subtypenspezifische Neutralisation unbehandelter und hitzeinaktivierter Seren von Regenbogenforellen aus verschiedenen Zuchtbetrieben.	47
2.5.1 Neutralisation des IPNV-Subtyps Sp (5. Passage)	50
2.5.2 Neutralisation des IPNV-Subtyps Sp (11. Passage)	51
2.5.3 Neutralisation des IPNV-Subtyps Ab (3. Passage)	51
2.5.4 Neutralisation des IPNV-Subtyps He (11. Passage)	52

	Seite
2.6 IPNV-subtypenspezifische Neutralisation unbehandelter und hitzeinaktivierter Regenbogenforellenserien aus Wildgewässern	54
2.7 IPNV-subtypenspezifische Neutralisation unbehandelter und hitzeinaktivierter Serien von aus Zuchtbetrieben und Wildgewässern stammenden Bachforellen, Seeforellen und Seesaiblingen	55
2.7.1 Serien von Bachforellen	55
2.7.2 Serien von Seeforellen	57
2.7.3 Serien von Seesaiblingen	58
2.7.4 IPNV-subtypenspezifische Neutralisation mit Serien von Regenbogenforellen, Seeforellen und Seesaiblingen aus einem Zuchtbetrieb.	59
2.8 Nachweis spezifischer Antikörper gegenüber den IPNV-Subtypen in Salmonidenserien mittels der Immuno-fluoreszenztechnik (IFT) und dem Neutralisationstest (NT)	60
IV. Besprechung und Ergebnisse	63
V. Zusammenfassung	72
VI. Summary	74
VII. Literaturverzeichnis	76

I. Einleitung

Die Verordnung zum Schutz gegen die ständige Gefährdung der Süßwasserfischbestände durch sog. Fischseuchen (Fischseuchen-Schutzverordnung, 1982) sieht zur amtlichen Feststellung der infektiösen Pankreasnekrose (IPN) bei Forellen klinische, pathologisch-histologische, virologische und serologische Untersuchungen vor.

Gemäß der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten (BGBI. I S. 1095; 13.07.1983) unterliegt die infektiöse Pankreasnekrose der Meldepflicht.

Das gesetzliche Untersuchungsverfahren zur Feststellung der IPN schreibt den Virus- oder Antigennachweis und, soweit die Größe der Fische eine Blutabnahme erlaubt, den Antikörpernachweis vor. Dieser soll mittels des Serum-Neutralisationstests, des Plaquesreduktionstests oder mit einem anderen geeigneten Untersuchungsverfahren durchgeführt werden.

Üblicherweise erfolgt der Antikörpernachweis mit dem Neutralisationstest nach der von WIZIGMANN et al. (1983a) beschriebenen Methode. Die Interpretation der seroepizootiologischen Untersuchungen bereitet im Falle der IPN vielfach Schwierigkeiten, da im Normalserum von Forellen vorkommende unspezifische Faktoren, wie z.B. der 6S-Faktor (Dorson et al., 1975; 1978), oftmals eine IPNV-Neutralisation vortäuschen.

In der vorliegenden Arbeit soll die humorale Immunantwort der Regenbogenforellen gegenüber den in der Bundesrepublik Deutschland isolierten IPNV-Subtypen Sp, Ab und He untersucht werden, wobei insbesondere die Spezifität der neutralisierenden Eigenschaften dieser Antikörper der Forellen zu ermitteln ist.

Mit den hierzu verwendeten Nachweismethoden (Neutralisationstest, NT; indirekte Immunfluoreszenz, IF) soll das Vorkommen und die Verbreitung der IPNV-Subtypen (Sp, Ab, He)spezifischen Antikörper bei kultivierten und wildlebenden Salmoniden in Deutschland festgestellt werden.

II. Schrifttum

1. Allgemeines

Im Jahre 1957 gelang es erstmals, ein fischpathogenes Virus, den Erreger der infektiösen Pankreasnekrose (IPN) zu isolieren (Wolf et al., 1960). Seit dieser Zeit wurden 50 verschiedene Viren oder virusähnliche Partikel bei Fischen ermittelt und teilweise isoliert. Insgesamt 11 dieser Isolate sind für Fischkrankheiten verantwortlich zu machen (Ahne und Wolf, 1980). Als Seuchenerreger bei Fischen im eigentlichen Sinn sind allerdings nur sechs der Isolate zu bezeichnen (Tabelle 1).

Tabelle 1

Die wichtigsten viralen Seuchenerreger
der Fische (nach Ahne, 1985)

Virusbezeichnung	Subtypen	Wirtsfische	Vorkommen
Channel Catfish Virus (CCV)	1	Gabelwels	USA
Virus der infektiösen Pankreasnekrose (IPNV)	9	Salmoniden und andere Fischarten	Europa Amerika Asien
Spring Viraemia of Carp Virus (SVCV)	2	Karpfen, Karausche, Silberkarpfen, Waller	Europa
Pike Fry Rhabdovirus (PFR)	1	Hecht, Schleie Graskarpfen, Güster	Europa
Virus der hämorrhagischen Septikämie (VHSV)	3	Regenbogen-, Bachforelle, Äsche, Hecht	Europa
Virus der infektiösen hämatopoetischen Nekrose (IHNV)	2	Lachse, Regen- bogenforelle	Nordamerika, Japan

2. Die infektiöse Pankreasnekrose (IPN)

Die infektiöse Pankreasnekrose (IPN) ist eine akut verlaufende Infektionskrankheit junger Salmoniden, die bisher nur bei in künstlichen Systemen gehaltenen Forellen mit hohen Mortalitätsraten beobachtet worden ist.

2.1 Vorkommen und Verbreitung der infektiösen Pankreasnekrose (IPN)

Seit den ersten gesicherten Befunden über die infektiöse Pankreasnekrose beim Bachsaibling (Salvelinus fontinalis) in den USA aus dem Jahre 1954 (Wood et al., 1955) und seit der Klärung der Virusätiologie der IPN durch WOLF et al. (1960), konnten weltweit (Europa, Nord- und Südamerika, Asien) IPN-Erreger isoliert werden. Das bisher bekannte Wirtsspektrum umfaßt Rundmäuler (1 Art), Knochenfische (37 Arten), Muscheln (6 Arten) und Krebse (3 Arten) (Ahne, 1985).

Tabelle 2

Vorkommen von IPNV bei verschiedenen Fischen, Krebsen und Muscheln
(Ahne, 1985)

Klasse Rundmäuler (Cyclostomata)

Flußneunauge (Lampetra fluviatilis)

Klasse Knochenfische (Teleostei)

Ordnung Lachsartige (Salmoniformes)

Lachsforelle	(<u>Salmo trutta trutta</u>)
Bachforelle	(<u>Salmo trutta fario</u>)
Regenbogenforelle	(<u>Salmo gairdneri</u>)
Atlantischer Lachs	(<u>Salmo salar</u>)
Blaurückenlachs	(<u>Oncorhynchus nerka</u>)
Keta-Lachs	(<u>O.keta</u>)
Kisutch-Lachs	(<u>O.kisutch</u>)
Wandersaibling	(<u>Salvelinus alpinus</u>)
Bachsaibling	(<u>Salvelinus fontinalis</u>)
Huchen	(<u>Hucho hucho</u>)
Äsche	(<u>Thymallus thymallus</u>)
Hecht	(<u>Esox lucius</u>)

Ordnung Aalartige (Anguilliformes)

Europäischer Aal	(<u>Anguilla anguilla</u>)
Japanischer Aal	(<u>Anguilla japonica</u>)

Ordnung Heringsartige (Clupeiformes)

Heringe	(<u>Brevoortia tyrannus</u>)
---------	--------------------------------

Ordnung Karpfenartige (Cypriniformes)

Zebrabärbling	(<u>Brachydanio rerio</u>)
Plötze	(<u>Rutilus rutilus</u>)
Rotfeder	(<u>Scardinius erythrophthalmus</u>)
Elritze	(<u>Phoxinus phoxinus</u>)
Brachsen	(<u>Abramis brama</u>)
Güster	(<u>Blicca bjoerkna</u>)
Nase	(<u>Chondrostoma nasus</u>)
Gründling	(<u>Gobio gobio</u>)

Fortsetzung Tabelle 2

Barbe	(<u>Barbus barbus</u>)
Schwaneifelbarbe	(<u>Barbodes schwanefeldi</u>)
Karpfen	(<u>Cyprinus carpio</u>)
Goldfisch	(<u>Carassius auratus</u>)
Sauger	(<u>Catostomus commersoni</u>)
Schlammpeitzger	(<u>Misgurnus anguillicaulatus</u>)
Schwertträger	(<u>Xiphophorus xiphidium</u>)

Ordnung Barschartige (Perciformes)

Sägebarsch	(<u>Dicentrarchus labra</u>)
Flußbarsch	(<u>Perca fluviatilis</u>)
Mocambique-Buntbarsch	(<u>Tilapia mossambica</u>)
Pompadourfisch	(<u>Symphysodon discus</u>)

Ordnung Plattfische (Pleuronectiformes)

Steinbutt	(<u>Scophthalmus maximus</u>)
Flunder	(<u>Paralichthys lethostigma</u>)
Seezunge	(<u>Solea solea</u>)

Klasse Muscheln (Bivalvia)

Europäische Auster	(<u>Ostrea edulis</u>)
Riesenauster	(<u>Crassostrea gigas</u>)
Amerikanische Auster	(<u>Crassostrea virginica</u>)
Platte Tellmuschel	(<u>Tellina tenuis</u>)
Venusmuschel	(<u>Mercenaria mercenaria</u>)
Gemeine Miesmuschel	(<u>Mytilus edulis</u>)

Klasse Schnecken (Gastropoda)

Gemeine Napfschnecke	(<u>Patella vulgata</u>)
Gemeine Strandschnecke	(<u>Littorina littorea</u>)

Klasse Krebstiere (Crustacea)

Strandkrabbe	(<u>Carcinus maenas</u>)
Garnele	(<u>Penaeus japonicus</u>)
Wasserfloh	(<u>Daphnia pulex</u>)

Klinisch manifeste IPN-Ausbrüche sind insbesondere bei der am häufigsten kultivierten Salmonidenart, der Regenbogenforelle (Salmo gairdneri), sowie bei Bachsaiblingen (Salvelinus fontinalis), bei Bachforellen (Salmo trutta fario) und bei Atlantischen Lachsen (Salmo salar) beobachtet worden. Aber auch die weiteren Salmoniden wie z.B. der Blaurückenlachs (Oncorhynchus nerka) oder der Seesaibling (Salvelinus alpinus) sind IPN-gefährdet. Die IPN-Infektion der Nichtsalmoniden, der Krebse und Muscheln verlaufen im allgemeinen symptomlos. Mindestens 8 von Muscheln isolierte IPNV-Erreger erwiesen sich aber als pathogen für Regenbogenforellen (Hill, 1982). Die Tatsache, daß das weit gefächerte IPNV-Wirtsspektrum der Erregerverbreitung dient, erschwert die IPNV-Bekämpfungsmaßnahmen.

2.2 Aufbau und Eigenschaften des IPNV

2.2.1 Aufbau

Das IPN-Virus besteht aus einem ikosaederförmigen unbehüllten Nukleokapsid von 60-65 nm Durchmesser (Dobos et al., 1979). Die 92 Kapsomeren des Virus sind in 80 Hexameren und 12 Pentameren angeordnet und setzen sich aus insgesamt 180 Protomeren zusammen (Cohen und Scherrer, 1974). Insgesamt lassen sich an einem IPN-Virion vier Strukturproteine unterscheiden (Dobos et al., 1979).

Der Sedimentationskoeffizient des IPNV beträgt 435 S, das Molekulargewicht 55×10^6 (Dalton); der Erreger hat eine Dichte von 1,33 g/CsCl (Dobos et al., 1979; Chang et al., 1977).

Die Nukleinsäure besteht aus zwei Segmenten Doppelstrang RNS, wobei ein Segment als m-RNS dient. Die Molekulargewichte der Nukleinsäurestränge belaufen sich auf $2,2 \times 10^6$ und $2,6 \times 10^6$ (Dobos et al., 1979).

Aufgrund der biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften wurde das IPN-Virus zusammen mit dem Drosophila X-Virus und dem Virus der infektiösen Bursitis der Hühner in der Familie der Birnaviridae zusammengefaßt.

2.2.2 Eigenschaften

Das IPN-Virus ist äther-, glycerin- und chloroform-stabil. Es ist säurebeständig aber laugenlabil. Gegenüber Hitzeeinwirkung ist der Erreger relativ widerstandsfähig, da er seine Infektiosität erst nach einer Stunde bei 60° C verliert. Das IPNV bleibt im eingetrockneten Zustand länger als 4 Wochen infektiös (Wolf et al., 1960; Wolf und Quimby, 1971; Ahne, 1982). Im Trinkwasser (10° C) ließ sich infektiöses IPNV länger als 230 Tage und im Teichschlamm bei 4° C 210 Tage nachweisen (Ahne, 1982). Tiefgefrieren (-20° C) und anschließendes Auftauen wies auf eine sehr unterschiedliche Stabilität gegenüber dem Einfrier-Auftauprozeß der einzelnen Isolate hin (Wolf und Quimby, 1971; McMichael et al., 1975; Dorson et al., 1978).

Eine Behandlung mit Jodophoren (100-200 ppm), Formalin (3 %), Natronlauge (2 %), UV-Strahlen (254 nm) und γ -Strahlen (mehr als 1 000 Krad) inaktiviert die Erreger innerhalb von 60 Minuten vollständig (Ahne, 1982).

IPN-Viren vermehren sich im Zytoplasma der Wirtszellen; die optimalen Vermehrungstemperaturen liegen zwischen 18 und 24° C; oberhalb von 28° C unterbleibt jedoch eine Virusreplikation (Roberts und Dobos, 1983). Das IPNV neigt zur Bildung defekter interferierender Partikel (DI). Diese inkompletten Viruspartikel verursachen in Zellkulturen keine zytopathogenen Effekte, sie sind für Autointerferenzerscheinungen verantwortlich (Ahne, 1980). Die Existenz von Carrierfischen wird mit dem Auftreten von DI-Partikeln in Verbindung gebracht (MacDonald und Yamamoto, 1978; Hedrick et al., 1978).

Anhand der antigenen Eigenschaften wurde bis vor kurzem zwischen 3 IPNV-Subtypen (IPNV-Sp, IPNV-Ab und IPNV-VR299) unterschieden. Neue detaillierte serologische Untersuchungen ergaben das Vorliegen von 2 IPNV-Serogruppen, wobei 9 IPNV-Subtypen der Serogruppe 1 und 1 IPNV-Serotyp der Serogruppe 2 angehören (Ahne, 1985) (Tabelle 3).

Tabelle 3

IPNV-Serogruppen und Subtypen (Ahne, 1985)

Referenzsubtyp	Originalwirt	Vorkommen	Autor(en)
Serogruppe 1			
IPNV-Sp	Regenbogenforelle	Europa, Nordamerika	Jørgensen und Brensballe (1969)
IPNV-Ab	Regenbogenforelle	Europa Asien	Jørgensen und Grauballe (1971)
IPNV-He	Hecht	Europa	Ahne (1978b)
IPNV-Te	Tellmuschel	Europa	Hill (1976)
IPNV-WB	Regenbogenforelle	Nordamerika Asien	Lientz und Springer (1973)
IPNV-Ja	Bachsaibling Regenbogenforelle	Kanada	Yamamoto (1974)
IPNV-C ₁	Atlantischer Lachs	Kanada	
IPNV-C ₂	Regenbogenforelle	Kanada	McDonald et al. (1983)
IPNV-C ₃	Seeforelle	Kanada	
Serogruppe 2			
IPNV-TV	Tellmuschel Karpfen	Europa	Underwood et al. (1977)

2.3 Krankheitsbild der IPN

Brut und Setzlinge von Salmoniden können bis zu einem Alter von 20-24 Wochen akut erkranken. Eine besondere Gefährdung besteht für die Tiere in der Anfütterungsphase. Regenbogenforellen sowie Saiblinge erleiden die höchsten Verluste, die bis zu 100 % betragen können, aber auch Bachforellen zeigen hohe Mortalitätsraten (Jørgensen, 1974). Die Lebensbedingungen der Tiere und deren Kondition aber auch die Erregerart beeinflussen die IPNV-Morbidität und Mortalität.

Die klinischen Symptome der IPN sind variabel. Dunkelfärbung, aufgetriebener Vorderbauch ("Erbsenbauch"), Haut- und Flossenhämmorrhagien, Exophthalmus sowie Verhaltensänderungen sind oft ausgeprägt.

Pathologisch-anatomisch lassen sich ein mit gelblichem katarrhalischem Exsudat gefüllter Magen-Darmtrakt und Hämmorrhagien im Pylorusbereich feststellen. Histologisch sind die Zellnekrosen im exkretorischen Pankreas, degenerative Nierenschäden sowie eine Enteritis für IPN kennzeichnend.

Die Überlebenden Tiere einer IPNV-Infektion werden zu IPNV-Carriern (Wolf et al., 1963; Wolf und Quimby, 1967).

Adulte Fische erkranken nicht, durchlaufen aber eine klinisch inapparente Infektion, die ebenfalls in einem Carrierstatus resultieren kann (Wolf und Quimby, 1969; Frantsi und Sava, 1971a; Reno et al., 1978). Die Carrier rate scheint bei Bachsaiblingen höher zu liegen als bei Regenbogenforellen, wie Bestandsuntersuchungen in Kanada ergeben haben. Mit einer lebenslangen Übertragungsgefahr durch Carrier muß gerechnet werden (Yamamoto, 1975a und 1975b; Yamamoto und Kilistoff, 1979).

2.4 Epizootiologie der IPN

Die Erregerausbreitung erfolgt durch belebte und unbelebte Vektoren. Neben dem horizontalen Übertragungsweg wird auch die vertikale Übertragung diskutiert.

2.4.1 Horizontale Virusübertragung

Akut erkrankte Tiere sowie klinisch inapparent infizierte Fische scheiden den Erreger über den Kot, die Sexualprodukte sowie möglicherweise auch über die Kiemen aus (Wolf et al., 1963; Jørgensen und Bregnballe, 1969; Ahne, 1983b). Neben Salmoniden als typischen Wirtsfischen tragen auch atypische Wirte (z.B. Hecht, Aal, Karpfen, Rotfeder u.a.) zur Ausbildung homonomer bzw. heteronomer Infektketten bei (Ahne, 1983a). Auch Zooplankton fungiert als Virusvektor (Ahne, 1980).

Neben aquatischen Organismen können u.a. Vögel (Möwen) und Säugetiere (Nerz) als mögliche IPNV-Vektoren dienen (Sonstegaard und McDermott, 1972).

Ein ausgezeichnete Virusvektor ist das Wasser. Experimentell erwies sich Flußwasser (10° C) auch nach 21 Tagen noch als infektiös (Ahne, 1982). Selbst im normalen, nicht konzentrierten Bodenseewasser konnte der Erreger isoliert werden (Ahne, 1980). Die Schalen der über das Wasser infizierten Forelleneier erwiesen sich auch nach dem Schlupf der Brut über drei Wochen hinweg als infektiös (Ahne und Negele, 1985). Daneben können tote infizierte Fische sowie Fischereigeräte als Virusverbreiter dienen (Ahne, 1983a).

2.4.2 Vertikale Virusübertragung

Forelleneier und Forellensperma erwiesen sich als IPNV-virushaltig (Wolf et al., 1963; Ahne, 1983b). Ungeklärt ist allerdings, ob der Erreger nur an der Eioberfläche haftet, oder ob er sich im Ei befindet. Den Beweis über eine vertikale IPNV-Transmission erbrachten BULLOCK et al. (1976) in einem grundlegenden Experiment mit infizierten Bachforelleneiern.

2.5 Faktoren, die den Ausbruch eines IPNV-bedingten Seuchengeschehens beeinflussen

2.5.1 Wirtssystem

In Mitteleuropa sind Brut- und Jungfische der Regenbogenforellen, Bachforellen und Bachsaiblinge am anfälligsten gegenüber dem IPNV, wobei die höchsten Verluste bei Saiblingen und Regenbogenforellen auftreten (Jørgensen, 1974a). Etwa ab dem 6. Monat besteht die Gefahr eines Seuchenausbruchs bei Forellen nicht mehr, da die Tiere mit zunehmendem Alter eine IPNV-Resistenz entwickeln (Frantsi und Savan, 1971b; Dorson et al., 1981). Die Ursache der mit dem Alter der Fische ansteigenden Resistenz ist noch unklar. Ältere Tiere sind meist klinisch inapparent infiziert und entwickeln humorale Antikörper (Wolf und Quimby, 1969; Frantsi und Savan, 1971a; Reno et al., 1978). Innerhalb der Fischarten existieren vermutlich genetisch bedingte Resistenzunterschiede, die die IPNV-Empfänglichkeit beeinflussen (Hill, pers. Mitt.). Bei Nicht-salmoniden verläuft die Infektion in der Regel ohne klinische Symptome.

2.5.2 Umweltfaktoren

Das Auftreten virulenter IPNV-Stämme in einem Salmonidenbestand muß nicht zwangsläufig zur Erkrankung und zu einem Seuchenausbruch bei den Jungfischen führen (Jørgensen und Bregnballe, 1969; Jørgensen und Grauballe, 1971). Faktoren, die unter den Oberbegriff "Streß" fallen, können jedoch das Krankheitsgeschehen erheblich beeinflussen. Eine Reduzierung der Besatzdichte führte beispielsweise zu einem Rückgang der Mortalitätsraten bei der Brut (Jørgensen und Bregnballe, 1969). Bei ausgewachsenen Carrierfischen konnte die IPN-Virusausscheidung über die Faeces durch Sauerstoffmangel erhöht werden (Frantsi und Savan, 1971a; Roberts und McKnight, 1976).

Auch die Wassertemperatur ist für den Ausbruch der IPN ein wichtiger Faktor, da diese die Körpertemperatur, die physiologischen Vorgänge und die Immunantwort der Fische beeinflußt. Darüber hinaus ist die Vermehrungsrate des Virus temperaturabhängig. Bei niederen Temperaturen (4-6° C) kommt es zu einer wesentlich

langsameren Vermehrung des IPNV als bei 15° C (Scherrer und Cohen, 1974). FRANTSI und SAVAN (1971b) beobachteten bei 2 Monate alten Bachforellen bei einer Wassertemperatur von 10° C eine Mortalitätsrate von 74 % innerhalb von 66 Tagen. Bei 15,5 ° C Wassertemperatur ergab sich hingegen eine Mortalität von 46 %, während bei 4,5° C alle Fische überlebten. Neuere Untersuchungen mit 3 Wochen alten Regenbogenforellen bestätigten diese Ergebnisse annähernd (Dorson und Torchy, 1981).

2.5.3 Virusfaktoren

Seuchenausbrüche sind neben Wirts- und Umweltfaktoren auch von der Erregervirulenz abhängig. Der IPNV-Subtyp Sp verursacht im allgemeinen höhere Verlustquoten (≥ 90 %) als der IPNV-Subtyp Ab (≤ 10 %) (Jørgensen und Kehlet, 1971). Die Virulenz der verschiedenen IPNV-Isolate ist in der Literatur sehr unterschiedlich beschrieben. Wegen fehlender Standardisierung der meisten Versuche sind die Ergebnisse oftmals nur bedingt vergleichbar.

Standardisierte Virulenzuntersuchungen (35 l Wasservolumen, Wassertemperatur 11 (± 1)° C, 300 Regenbogenforellenbrütlinge (8-10 Wochen alt), Infektionsdosis : 10^4 PFU/ml Wasser, Beobachtungszeit: 30 Tage) ergaben für die in England aus Forellen isolierten IPNV-Sp Isolate einen ähnlichen Virulenzgrad (43-56 % Mortalität) der weniger als 5x in Zellkulturen passagierten Viren (Hill und Dixon, 1977). Die Herkunft der Isolate (alte Carrierfische, klinisch inapparent erkrankte Tiere, klinisch erkrankte Tiere) war dabei ohne Einfluß. Eine nur geringe Mortalität (15 %) ergab der europäische Referenzstamm IPNV-Subtyp Ab. Auch die Isolate von Nichtsalmoniden waren für Forellen im allgemeinen nur schwach pathogen (6-10 % Mortalität), wobei ein Isolat vom Karpfen mit 60 %iger Mortalität eine Ausnahme darstellte (Hill, 1982).

Nicht gerade vereinfacht wurde das Verständnis über die Mechanismen der IPNV-Infektion durch die Beobachtung, daß durch Zellkulturpassagen die Virulenz des IPNV-Subtyps Sp beeinflußt wird.

Ursprünglich pathogene Isolate dieses Subtyps (75 % Mortalität bei 7 Wochen alten Regenbogenforellen) wurden nach 5-7 Zellkulturpassagen in Regenbogen-gonadenzellen (RTG-2, Wolf und Quimby, 1962) apathogen, die durchschnittliche Plaquesgröße nahm um das Vierfache zu und die Isolate wurden im Gegensatz zu vorher, von normalem Forellenserum, mit Serumverdünnungen bis zu 1 : 5000, neutralisiert (Dorson et al., 1975; Dorson et al., 1978). Diese Neutralisation ist durch ein im normalen Forellenserum vorkommendes Protein (Sedimentationskoeffizient : 6 S) bedingt (Jørgensen, 1973; Dorson und deKinkelin, 1974). KELLY und NIELSEN (1985) wiesen darauf hin, daß auch andere IPNV-Isolate eine 6 S-Sensitivität aufweisen (amerikanischer Referenzstamm VR 299, Isolat TV und IPNV-Jasper).

Die Zusammenhänge zwischen Wirtszellen, Zellkulturpassagen, Virulenz und 6S-Sensitivität wurden von HILL und DIXON (1977) untersucht. Die Autoren beobachteten, daß die Entstehung der Avirulenz nicht parallel mit der Ausbildung der 6S-Sensitivität verläuft. Die Virulenz des IPNV ist zellkulturpassagenabhängig, während die 6S-Sensitivität zellartabhängig ist.

Drei forellenapathogene 6S-sensitive IPNV-Isolate mit hoher Zellkulturpassagenzahl wurden durch Zusatz von normalem Forellenserum zum Wachstumsmedium (Verdünnung: 1 : 100) 6S-resistent. Nur zwei der Isolate erwiesen sich anschließend als pathogen für Forellenbrut. Eine direkte Verknüpfung zwischen Virulenz und 6S-Resistenz scheint fraglich (Hill u. Dixon, 1977).

Eine Aktivimmunisierung mit avirulenten 6S-sensitiven IPNV-Stämmen als Lebendimpfstoff blieb erfolglos, da sich weder ein Antikörpertiter im Blut noch ein Schutzeffekt der geimpften Fische gegenüber einer Neuinfektion mit virulentem IPNV einstellte. Die Verimpfung von virulenten, 6S-resistenten IPNV-Isolaten führte hingegen fast regelmäßig bei immunkompetenten Forellen zur Bildung von humoralen Antikörpern. Eine Koppelung der immunogenen Wirkung mit dem Virulenzfaktor scheint daher gegeben zu sein (Hill und Dixon, 1977).

2.6 Immunologie

Die immunkompetenten Organe der Fische sind Kopfniere, Milz, Thymus sowie das lymphatische Gewebe des Verdauungskanal (Dorson, 1984). Ebenso findet man bei Fischen Makrophagen, Lymphozyten sowie Plasmazellen, die bei der Immunantwort eine Rolle spielen. Eine Aufgabenspezialisierung der Lymphozyten, ähnlich der der B- und T-Lymphozyten bei Säugern, existiert auch bei Teleosteen (Cuchens und Clem, 1977).

Die Antikörper der Knochenfische bestehen aus vier Ig-Molekülen (Tetramere) mit einem Strukturgerüst aus jeweils zwei schweren (H) sowie zwei leichten (L) Polypeptidketten. Diese Tetramere sind aufgrund des Molekulargewichtes von etwa 700 000 (Dalton) dem IgM-Typ der Immunglobuline zuzuordnen (Dorson, 1981).

Forellen bilden nach einer Infektion mit IPN-Viren Antikörper aus (Wolf et al., 1963; Wolf und Quimby, 1969). Die IgM-Natur dieser virusneutralisierenden Immunglobuline wurde durch JØRGENSEN (1973) bestätigt. Experimentell induziert, treten sie etwa 30 Tage p.i. bei einer Wassertemperatur von 10° C auf und erreichen drei Monate p.i. ihre höchsten Titerwerte im Serum (Jørgensen, 1973; Agniel, 1975). Die Antikörper können über längere Zeiträume (bis zu mehreren Jahren) im Fisch persistieren (Dorson, 1984).

Eine passive Übertragung der IPNV-Immunität ist möglich (Agniel, 1975). Hingegen scheint eine Übertragung maternaler Antikörper auf die Nachkommenschaft über das Eidotter nicht vorzukommen (Dorson und Torchy, 1985; deKinkelin et al., 1984).

Die Immunantwort gegenüber IPNV ist fischspeziesabhängig und individuell unterschiedlich. Regenbogenforellen zeigen höhere Antikörpertiter als Bachsaiblinge (Wolf und Quimby, 1969; Yamamoto, 1975a, b). Auch Umweltfaktoren beeinflussen die Antikörperbildung. Geringe Wassertemperaturen (5° C) führen zu niedrigen Antikörpertitern im Serum (Maisse und Dorson, 1976).

JØRGENSEN (1973) beobachtete bei der Untersuchung von Regenbogenforellenserum aus einem IPN-freien Betrieb eine Neutralisation des IPNV-Subtyps Sp. DORSON und DeKINKELIN (1974) wiesen in den Seren gesunder Forellen ein IPNV-neutralisierendes Protein mit einem Sedimentationskoeffizienten von 6S nach. Dieser nicht IPNV-induzierte 6S-Faktor ist bei Forellen weit verbreitet und kann beim indirekten IPNV-Nachweis mit Hilfe des Serumneutralisationstestes zu falschpositiven Werten führen (Ahne, 1985).

Eine Inaktivierung dieses Faktors wird durch 30-minütiges Erhitzen der Seren bei 56° C erreicht (Dorson, 1977a). Im allgemeinen wird das 6S-Protein als ein unspezifischer Resistenzfaktor angesehen.

2.7 Diagnose der IPN

Die Diagnose der IPN erfolgt durch den direkten oder indirekten Virusnachweis. Epizootiologische, pathologisch-anatomische sowie histologische Befunde können Hinweise auf das Vorliegen der infektiösen Pankreasnekrose geben. Für die Erregeranzucht und Vermehrung werden in der Routinediagnostik u.a. RTG-2 Zellkulturen (Rainbow trout gonads; Wolf und Quimby, 1962) sowie PG-Zellkulturen (Pike gonads; Ahne, 1979) erfolgreich eingesetzt. BOVO et al. (1985) testeten außerdem verschiedene Zellkulturen (BF-2 (Blue gill; Wolf und Quimby, 1966), EPC (Epithelioma papulosum; Fijan et al., 1983), FHM (Fathead minnow; Gravell und Malsberger, 1965)) auf ihre IPNV-Empfänglichkeit. PG-Zellen erwiesen sich dabei als das empfindlichste Zellkultursystem für das IPN-Virus (Tabelle 4).

Tabelle 4

Relative Sensitivität von 5 Zellkulturen gegenüber
IPNV (nach Bovo et al., 1985)

Zellen	PG	BF-2	RTG-2	EPC	FHM
PG	1,0	0,69	0,36	0,15	0
BF-2	1,44	1,0	0,52	0,22	0
RTG-2	2,75	1,91	1,0	0,42	0
EPC	6,46	4,47	2,34	1,0	0

Nach Standardmethoden (Wizigmann et al., 1983a) mit virushaltigem Organ-homogenisat beimpfte Zellkulturen zeigen innerhalb von 3-4 Tagen bei 15° C Inkubationstemperatur deutliche lytische Zellveränderungen. Die Identifizierung der Erreger erfolgt serologisch (Neutralisationstest, Immunoperoxidase, Immunofluoreszenz) mit Hilfe von spezifischen Antisera. Als schneller Nachweis des IPNV ist die Gefrierschnittimmunofluoreszenz in Gebrauch. Bereits drei Tage p.i. konnte mit dieser Methode im Pankreasgewebe infizierter Forellen das IPNV nachgewiesen werden (Swanson, 1981).

AGIUS et al. (1982, 1983) verweisen auf die höhere Nachweisempfindlichkeit der Co-Kultivierungsmethode (Antrysinieren von IPN-virushaltigen Geweben und anschließende Verimpfung auf Zellkulturen) gegenüber der normalen Isolierungsmethode.

Mit Hilfe der Co-Kultivierung von Leukozyten, die aus Blutproben von Carrier-fischen stammten, konnten in 75 % der Fälle Carrier ermittelt werden (Yu et al., 1982). Eine Tötung der Fische erscheint daher zur Ermittlung von Carriern bei entsprechend größerer Probenzahl nicht nötig zu sein.

Der indirekte IPNV-Nachweis ergibt keine eindeutigen Aussagen über den IPNV-Durchseuchungsgrad. Forellen, die eine IPNV-Infektion überleben, können jede Kombination zwischen hohen und niedrigen Virustitern in den Organen sowie hohen und niedrigen Antikörpertitern im Serum aufweisen (Reno et al., 1978; Dorson, 1981). Mehrmals wurde allerdings beobachtet, daß Carrier nur geringe bzw. keine Serumantikörpertiter ausbilden (Wolf et al., 1963; Billy und Wolf, 1969; Yamamoto, 1975b).

Aufgrund der Persistenz der Antikörper im Fisch über Zeiträume von mehreren Jahren hinweg (Dorson, 1984) wird die Aussagekraft der Antikörperrnachweise bezüglich der Erregerpräsenz beeinträchtigt. Hinzu kommt, daß der 6S-Faktor, der zellkulturadaptierte IPN-Viren zu neutralisieren vermag, zu falsch-positiven Befunden führen kann (Dorson et al., 1975).

Eine Hitzeinaktivierung der zu untersuchenden Forellenserren sowie die Verwendung 6S-resistenter IPN-Virusstämme ist daher für die IPN-Serodiagnostik empfehlenswert (Ahne, 1985).

2.8. IPNV-Bekämpfung

Nach HILL (1982) ist die infektiöse Pankreasnekrose eine weltweit (Europa, Amerika, Asien) verbreitete Viruserkrankung der Forellen. Durch das weite Wirtsspektrum ist das IPNV tief in den jeweiligen Biozöosen verankert. Die Seuchenbekämpfung kann daher nicht die Erregerausrottung zur Grundlage haben, vielmehr muß durch die Immunprophylaxe bzw. durch Desinfektion, Hygiene sowie durch allgemeine seuchenhygienische Maßnahmen eine Verlust-reduzierung angestrebt werden (Ahne, 1985).

Anzusetzen hat die Seuchenbekämpfung in den Zuchtbetrieben, da IPNV-bedingte Verluste nur bei Forellen in der Brut- und Jungfischphase auftreten (Ahne, 1985). Zur Eierbrütung und zur Brutaufzucht muß oberflächenunabhängiges Wasser verwendet werden, da das Wasser einen ausgezeichneten IPNV-Vektor

darstellt (Ahne, 1982). So haften z.B. die aufgrund kontaminierten Wassers an der Oberfläche der gehärteten Forelleneier adsorbierten Erreger wochenlang (Ahne und Negele, 1985). Auch für Desinfektionsmittel sind die Erreger dort nicht zugänglich (Bullock et al., 1976). Eine prophylaktische Desinfektion mit Jodophoren sollte daher während der Befruchtung vorgenommen werden (Ahne, 1985).

Ein geeigneter Impfstoff gegenüber IPNV ist zur Zeit nicht verfügbar. Das mutmaßliche Nichtvorhandensein maternaler IPN-Antikörper (Dorson, 1984; deKinkelin et al., 1984), die späte Immurkompetenz der Jungfische (14 Tage nach Schlupf) (Munro und Duncan, 1977; Ellis, 1977) sowie die spezifische Reaktion der Antikörper (der Schutz gegenüber einem IPNV-Subtyp vermittelt keinen Schutz gegenüber einem anderen IPNV-Subtyp; de Kinkelin et al., 1984) lassen die praktische Nutzenanwendung der Vakzinierung fraglich erscheinen. Experimentell wurden bisher mit der intraperitonealen Verabreichung einer formalininaktivierten IPNV-Vakzine bei Jungfischen Immunisierungserfolge erzielt (Dorson, 1977b). Auch eine Immunisierung über das Wasser mit einem spontan attenuiertem IPNV-Stamm vom Barsch gelang bei Jungforellen (Hill et al., 1980). Die Wassertemperaturen betrugen in beiden Experimenten 10 bis 12° C. Innerhalb von 21 bis 30 Tagen entwickelten sich IPNV-neutralisierende Antikörper, und die Tiere waren gegen eine Reinfektion resistent.

Die Verimpfung zellkulturattenuierter IPNV-Stämme sowie von IPNV-Spaltprodukten unter Anwendung verschiedener Applikationsmethoden (hyperosmotische Infiltration, Immunisierung über das Futter) zeigten keinen Erfolg (Dorson, 1977b). Eine Chemotherapie bereits erkrankter Jungfische mit Virazolen führte zu keinem meßbaren Rückgang der Mortalitäten (Savan und Dobos, 1980). Konditionsverbessernde Stützmaßnahmen (Schlotfeldt, 1979) wie auch eine Erhöhung der Wassertemperatur auf 16° C (Dorson und Torchy, 1981) können dagegen die IPNV-bedingten Mortalitätsraten reduzieren.

2.9 Serologische Nachweismethoden des IPNV

Serologische Nachweismethoden basieren auf einer spezifischen Antigen-Antikörperreaktion und eignen sich entweder zur Identifizierung des Erregers oder zum Nachweis spezifischer Antikörper.

In der Routinediagnostik sind der Neutralisationstest (NT) und die direkte bzw. indirekte Immunofluoreszenztechnik die am häufigsten angewendeten Methoden. Die Immunoperoxidasetechnik (IPT), die Komplementbindungsreaktion (CF) oder der Hämagglutinationstest (HA) sind weniger gebräuchliche Methoden (Ahne, 1981).

2.9.1 Der Neutralisationstest (NT)

Der NT-Test ist die gebräuchlichste Methode zur Identifizierung und Typisierung von IPNV sowie zum Nachweis IPNV-spezifischer Antikörper.

Die Zugehörigkeit vieler, aus aquatischen Organismen gewonnener, Virusisolate zum IPNV-Komplex sowie deren Verwandtschaftsgrade untereinander wurde mit Hilfe des NT-Tests erkannt (Jørgensen und Grauballe, 1971; Wolf und Quimby, 1971; Ahne, 1980; Hill, 1982). Nahe verwandte IPNV-Subtypen konnten mit dem kinetischen NT-Test unterschieden werden (Nicholson und Pochebit, 1981).

Der Vorteil des NT-Tests liegt in seiner hohen Spezifität. NICHOLSON und POCHEBIT (1981) differenzierten mit dem kinetischen Neutralisationstest 12 serologisch nahe verwandte IPNV-Isolate. Nachteilig ist der hohe Zeitaufwand (7 Tage) bis zum Vorliegen der Ergebnisse sowie die Tatsache, daß der Test nur in lebenden Systemen (Zellkulturen, Versuchstiere) durchgeführt werden kann (Mayr et al., 1977). Zusätzlich können defekte interferierende Partikel (DI), die in IPNV-Suspensionen regelmäßig zu finden sind, die Resultate von Kreuzneutralisationen verfälschen (Ahne, 1981).

Durch die Existenz des 6S-Faktors (2.5.3) werden die Interpretationen der Ergebnisse der Neutralisationsteste bei seroepizootologischen Untersuchungen sehr erschwert.

2.9.2 Die Immunfluoreszenztechnik (IFT)

Die Immunfluoreszenz wird routinemäßig zur raschen Diagnose von Virusinfektionen sowie zum Nachweis von virusspezifischen Antikörpern eingesetzt. Die Lokalisierung von Virusantigenen, der zeitliche Ablauf von Infektionen, die Bildung verschiedener Virusantigene, defekte Viruspartikel, nicht zytopathogene Virusinfektionen wie auch die Pathogenese von Virusinfektionen werden mit der IF-Technik erforscht (Mayr, et al., 1977).

Zwei unterschiedliche Techniken kommen zur Anwendung. Bei der direkten Methode werden Antikörper gegen das virale Antigen direkt mit Fluorchrom markiert, wohingegen bei der indirekten Methode die Antikörper, die gegen die Immunglobuline der Tierart gerichtet sind, von der das virusspezifische Antiserum abstammt, mit Fluorchrom gekennzeichnet werden.

Die indirekte Methode wird gegenüber der direkten Methode bevorzugt, da hier die Empfindlichkeit 5-30mal höher ist (Espmark et al., 1971), fluorchrommarkierte Speziesantikörper im Handel zu kaufen sind und virusspezifisches Antiserum eingespart wird (Mayr et al., 1977). Die Nachteile der indirekten Methode liegen in einem hohen Maß an unspezifischen Reaktionen sowie dem höheren Zeitaufwand.

Jørgensen (1974b) wies mittels der indirekten Fluoreszenztechnik IPNV in Zellkulturen nach. Auch in Seren experimentell infizierter Forellen - nicht dagegen in Feldseren - gelang es dem Autor, IPNV-spezifische Antikörper mit dieser Methode zu ermitteln. SWANSON und GILLESPIE (1981) verfolgten anhand von Gefrierschnitten den Ablauf einer IPNV-Infektion. Bereits ab dem 3. Tag p.i. war IPNV im Pankreasgewebe festzustellen.

Der Nachweis von IPNV in Gewebsgefrierschnitten wird inzwischen routinemäßig durchgeführt.

III. Eigene Untersuchungen

1. Material und Methoden

1.1 Untersuchungsmaterial

In den Monaten Juli, August und September der Jahre 1983 und 1984 wurden von Regenbogenforellen (Salmo gairdneri), Bachforellen (Salmo trutta fario), Seeforellen (Salmo trutta lacustris) sowie von Seesaiblingen (Salvelinus alpinus) Blutproben gezogen. Die Tiere stammten aus 24 willkürlich ausgewählten bayerischen Zuchtbetrieben und 6 Wildgewässern.

Von den betäubten Fischen (Elektroschock bzw. 0,007%ige Tricain-Methan-Sulfonat-Lösung: MS222[®] - Sandoz) ist aus der Aorta bzw. der Vena caudalis das Blut unter sterilen Kautelen entnommen worden. Die Blutmenge pro Fisch betrug durchschnittlich 6-8 ml. Die individuell gesammelten Blutproben wurden in Kühlgefäßen sofort ins Labor gebracht. Nach der Koagulation des Blutes (12 Std., 8° C) sind die Seren abgenommen und in sterilen Glasfläschchen bei -20° C gelagert worden.

Als Kontrollseren dienten Blutproben von Regenbogenforellen aus englischen IPNV-freien Forellenzuchtbetrieben¹⁾ sowie Blutproben von seit mehreren Generationen unter SPF-Bedingungen gehaltenen Regenbogenforellen²⁾.

1) freundlicherweise von Herrn Dr. Schlotfeldt, Hannover, zur Verfügung gestellt

2) Geschenk des Fischgesundheitsdienstes, Grub

Tabelle 5:

Aufschlüsselung der Serumproben nach Fischart und Herkunft

Art	Probenanzahl			
	Zuchtbetriebe	Wildgewässer	SPF-Haltung	Gesamtproben
Regenbogenforelle	110*	4	16	130
Bachforelle	-	11	-	11
Seeforelle	4	2	-	6
Seesaibling	2	3	-	5

* = inkl. 8 Serumproben aus 4 englischen Betrieben

1.2 Zellkulturen

Als Zellkulturen dienten Hechtgonadenzellen (PG-Zellen; Ahne, 1979) und Forellengonadenzellen (RTG-2; Wolf und Quimby, 1962).

Die Zellen wuchsen mit Medium TC 199 (Flow), angereichert mit 10 % fötalem Kälberserum (Biochrom KG) und Antibiotika (Penicillin, 100 IE/ml; Streptomycin, 100 µg/ml; Amphotericin B, 2,5 µg/ml), bei 20° C in Plastikflaschen (Falcon, 25-175 cm²) und Mikrotiterplatten (Falcon, Micro Test III, 96 well) innerhalb von 24 Stunden zu Monolayern aus. Wurde mit Plaquesplatten (24 flat-bottom wells, 2 cm²; Falcon) im "offenen System" gearbeitet, so ist das TC 199 Medium mit Hepes-Puffer-Zusatz (2,38 g/l) verwendet worden.

Die Subkultivierung erfolgte mit einer Saline-Trypsin-Versen-Lösung (STV) mit Aufteilungsraten von 1:2 - 1:3. Eingesät wurden die Zellen in einer Dichte von 10^6 Zellen/ml Medium. Dichtgewachsene Kulturen wurden bei 15° C aufbewahrt.

Die PG-Zellen (57.-159. Subkultur) dienten vorwiegend der Vermehrung und Quantifizierung der Viren; mit ihnen wurden die Neutralisationsteste durchgeführt. Die RTG-2-Zellen (98.-110. Subkultur) sind für die Immunfluoreszenz eingesetzt worden.

1.3 Virusstämme

Für die Untersuchungen sind folgende Subtypen des Virus der infektiösen Pankresnekrose (IPNV) verwendet worden:

- IPNV-Subtyp Sp¹⁾ (656-Grub, 5. Passage)
- IPNV-Subtyp Sp¹⁾ (656-Grub, 11. Passage)
- IPNV-Subtyp Ab²⁾ (Weymouth, 3. Passage)
- IPNV-Subtyp He (Laborstamm, 5. Passage)
- IPNV-Subtyp He (Laborstamm, 11. Passage).

Im Kreuzneutralisationstest erfolgte die Überprüfung der Identität der plaquesgereinigten Virussubtypen mit spezifischen Antiseren, die freundlicherweise von Dr. B. Hill, England, überlassen worden waren. Die Virusanzucht erfolgte nach der Adsorptionsmethode bei 15° C. Cytopathische Effekte (CPE) traten 36-72 Stunden p.i. auf. Der Kulturüberstand der infizierten Zellen ist nach dem Zentrifugieren (3×10^3 U/min., 20 Minuten) titriert und portioniert (1 ml) eingefroren (- 70° C) worden.

1) Freundlicherweise von Prof. Dr. G. Wizigmann, Grub, zur Verfügung gestellt.

2) Von Dr. B. Hill, England, überlassen.

1.4 Virustitration

1.4.1 Mikrotitermethode

Die Virussuspensionen wurden in 10er Potenzen (10^{-1} - 10^{-8}) mit Medium TC 199 (2 % fötaler Kälberserumzusatz) verdünnt. In Volumina von 0,1 ml pro Vertiefung sind die Virusverdünnungen anschließend auf in Mikrotiterplatten gezüchtete PG-Zellen verimpft worden. Pro Verdünnungsstufe wurden 3 Reagenten eingesetzt. Die Endablesung erfolgte 7 Tage p.i. aufgrund des CPE. Die Infektiositätstiter wurden nach der Methode KÄRBER (1931) errechnet.

1.4.2 Plaquesmethode

In 10er Potenzen verdünnte Virussuspensionen wurden auf die in Plaquesplatten gezüchteten PG-Zellen nach der Adsorptionsmethode verimpft. Nach Absaugen des Inokulums sind die infizierten Zellen mit Agarose(1 %)-haltigem Medium (39° C) überschichtet worden (0,5 ml). Nach der Gelbildung wurden 0,5 ml TC 199 (2 % FKS) in die Plattenvertiefungen einpipettiert. Die Fixierung der Kulturen erfolgte 72 Stunden p.i. mit 38%igem Formalin; gefärbt wurden die Zellen mit Kristallviolett. Die plaquesbildenden Einheiten (PFU) wurden nach der Plaquesauszählung rechnerisch ermittelt (Bonin, 1973).

1.5 Plaquesgrößenbestimmung

Zur Plaquesgrößenbestimmung wurden die mit den verschiedenen Virussubtypen infizierten Zellkulturen 48 Stunden p.i. fixiert und gefärbt. Die Ermittlung der Plaquesdurchmesser erfolgte mikroskopisch unter Zuhilfenahme einer Netzstrichplatte (10 x 10 in 0,5 mm; Ernst Leitz, Wetzlar GmbH). Im Durchschnitt sind 160 Plaques pro Virussubtyp vermessen worden.

1.6 Virusisolierung

Zur Virusisolierung sind die Fische (<5 cm) bzw. die inneren Organe (Leber, Niere, Milz) der Fische (>5 cm) nach Standardmethoden (Wizigmann et al., 1983a) aufgearbeitet worden. Die Infektiositätstiter (PFU/0,1 g Homogenisat) wurden mit der Plaquesmethode (1.4.2) ermittelt.

1.7 Virulenz der Virussubtypen IPNV Sp (5. Passage), IPNV Sp (11. Passage), IPNV Ab (3. Passage) und IPNV He (11. Passage)

In abgedeckten Kunststoffbecken (Wasservolumen: 8 Liter) wurden je 100 Regenbogenforellen (40 und 90 Tage alt, 0,1 bis 0,2 g schwer) bei einer Wassertemperatur von $8,5 \pm 1^\circ \text{C}$ und einem Zufluß von $5 \pm 2 \text{ l}$ Leitungswasser pro Stunde gehalten. Nach einer einwöchigen Eingewöhnungszeit sind die Tiere über das Wasser infiziert worden (Ahne, 1978b). Die Infektionstiter betrugen 3×10^3 PFU/0,1 ml Wasser.

Täglich wurden die Mortalitätsraten ermittelt, tote Fische entnommen und diese bei -20°C eingefroren. In wöchentlichen Abständen wurden die gestorbenen Tiere auf IPN-Viren untersucht (Methode: 1.6). Die den Versuch (5 Wochen) überlebenden Tiere sind ebenfalls auf Viruspräsenz überprüft worden.

Mit einer Ausnahme (IPNV-Subtyp Sp (5. Passage)) wurden alle Versuche 2fach durchgeführt, wobei jeweils mehrere Kontrollansätze mitliefen. In den Abbildungen 5, 6, 7 und 8 sind jeweils die höchsten Kontrollmortalitäten eingezeichnet. Die Endmortalität (M_G) wurde als Differenz der Mittelwerte der Sterberaten der infizierten Tiere (M_I) und der der Kontrolltiere (M_K), ($M_g = M_I - M_K$), in Prozent angegeben.

1.8 Antiserenherstellung

1.8.1 Antigenaufbereitung

Die Viruspartikel der zellfrei zentrifugierten ($20 \text{ Minuten bei } 3 \times 10^3 \text{ U/Min}$) Virussuspension (11 ml) wurden durch Ultrazentrifugieren (Beckman-Ultrazentrifuge L5-50B; Rotor SW 50.1) bei $40\,000 \text{ U/min}$ für 2 Stunden pelletiert. Das in PBS (11 ml) aufgenommene Sediment kam anschließend zur Titration.

1.8.2 Immunisierung der Fische

Pro Virussubtyp sind jeweils 10 individuell markierte Regenbogenforellen (200 g; SPF-Zucht, Fischgesundheitsdienst Grub), mit $10^{6,5} - 10^{7,5} \text{ KID}_{50} / \text{Fisch}$ des entsprechenden Virus intraperitoneal beimpft worden.

Den narkotisierten (MS 222[®]) Forellen wurden vor der Infektion und in monatlichen Abständen nach der Infektion ca. 1 ml Blut aus der caudalen Vene entnommen. Die Gewinnung des Serums erfolgte nach der unter 1.1 beschriebenen Methode.

Die Einzelseren von 4 Fischen pro Infektionsgruppe dienten sowohl im unbehandelten als auch im hitzeinaktivierten (56° C , 30 min.) Zustand dem Antikörpernachweis mit dem Neutralisationstest bzw. mit der Immunfluoreszenztechnik (hitzeinaktivierte Seren).

1.9 Serologische Arbeitsmethoden

1.9.1 Neutralisationstest

Die Neutralisationsteste wurden im Mikrotitersystem nach der Sukzessivmethode durchgeführt (Wizigmann et al., 1983a). Als Antigene dienten folgende, mit spezifischen Antisera¹⁾ typisierten IPNV-Subtypen:

IPNV-Subtyp Sp (656-Grub, 5. Passage)

IPNV-Subtyp Sp (656-Grub, 11. Passage)

IPNV-Subtyp Ab (Weymouth, 3. Passage)

IPNV-Subtyp He (Laborstamm, 11. Passage).

Alle im Test verwendeten Seren sind sowohl im inaktivierten (56° C, 30 Minuten) als auch im nicht inaktivierten Zustand verwendet worden.

Die in 2er Potenzen verdünnten Seren kamen mit einem gleichen Volumen (0,025 ml) der jeweiligen Virussuspension (200 KID₅₀/0,1 ml) für 1 Stunde bei 20° C zur Reaktion. Verimpft wurden 0,05 ml des Reaktionsgemisches (12-Kanalpipette) pro Mikrotiterplattenvertiefung auf 24 Stunden alte PG-Zellen. Die Ablesung der bei 15° C inkubierten Kulturen erfolgte 7 Tage p.i.. War eine Ablesung aufgrund der Serumtoxizität nicht möglich, so wurden 0,025 ml des Zellkulturüberstandes jeder Plattenvertiefung auf 48 Stunden alte PG-Zellen (Mikrotiterplatten) neu verimpft und ebenfalls nach 7 Tagen abgelesen. Die Neutralisationstiter (ND₅₀) wurden nach der Methode von KÄRBER (1931) errechnet.

Neutralisationstiter $< 2^{0,83}$ sind als "negativ" bezeichnet worden. Die Seren wurden bis zu einer Verdünnung von 2^7 ausgetitert.

1) Freundlicherweise von Dr. B. Hill, England, überlassen.

Die R-Werte (Kreuzneutralisationstest) wurden nach der Formel von ARCHETTI und HORSFALL (1950) ermittelt:

$$R = r_1 \times r_2$$

$$r_1 = \frac{\text{Titer Antiserum 1 mit heterologem Virus 2}}{\text{Titer Antiserum 1 mit homologem Virus 1}}$$

$$r_2 = \frac{\text{Titer Antiserum 2 mit heterologem Virus 1}}{\text{Titer Antiserum 2 mit homologem Virus 2}}$$

1.9.2 Immunofluoreszenz

Angewendet wurde die indirekte Fluoreszenzmethode. RTG-2 Zellen sind hierbei mit 0,001 KID₅₀/Zelle der IPNV-Subtypen Sp (5. Passage), Ab (3. Passage) und He (11. Passage) infiziert worden. Nach einer Inkubationszeit von 24-48 Stunden bei 15° C erfolgte die Fixierung mit Aceton für die Fluoreszenzspektroskopie (Merck) für 10 Minuten bei 25° C. Nach Lufttrocknung sind die Zellen nacheinander (mit 3 dazwischenliegenden PBS-Spülungen) mit inaktiviertem (56° C, 30 Minuten) IPNV-spezifischen, in 2er Potenzen verdünnten Forellenantiserum und mit FITCmarkiertem Schaf-anti-Forellen IG-Immoglobulin¹⁾ überschichtet worden (37° C, 45 Minuten; feuchte Kammer). Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Leitz-Dialuxmikroskop (Erregerfilter KP 490).

1) Von der Firma Biochrom, Berlin, zur Verfügung gestellt.

2. Ergebnisse

2.1 Virusidentifizierung

Die für die Experimente in PG-Zellen vermehrten IPN-Viren ($KID_{50} 10^{6,5}-10^{7,5}$) sind im Kreuzneutralisationstest mit Hilfe spezifischer Antiseren gegenüber IPNV-Subtyp Sp, IPNV-Subtyp Ab und IPNV-Subtyp He auf ihre Identität überprüft worden.

Höchste Neutralisationstiter wurden jeweils mit den spezifischen Antiseren erzielt (Tab. 6): IPNV-Subtyp Sp 1 : 46 341 - 1 : 116 502; IPNV-Subtyp He 1 : 58 251 und IPNV-Subtyp Ab 1 : 29 125. Zwischen allen Viren wurden auch serologische Kreuzreaktionen festgestellt, was auf eine Serogruppenverwandtschaft schließen läßt. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann jedoch die Homologie zwischen Antigen und Antikörper gefolgert werden, wodurch die jeweiligen IPNV-Isolate subtypenspezifisch eindeutig identifiziert werden konnten.

Tabelle 6 zeigt die reziproken Werte der Neutralisationstiter der Antiseren mit den zu identifizierenden Virusstämmen. In Tabelle 7 sind die dazugehörigen R-Werte (Archetti und Horsfall, 1950) dargestellt.

Tabelle 6

Neutralisationstiter (reziproke Werte) der für die Experimente vorgesehenen Virusisolate mit Antiseren gegenüber den IPNV-Referenzsubtypen Sp, Ab und He

Virus	Antiserum gegenüber		
	IPNV-Sp	IPNV-Ab	IPNV-He
IPNV-Sp (5. Passage)	<u>46 341</u>	362	114
IPNV-Sp (11. Passage)	<u>116 502</u>	572	724
IPNV-Ab (3. Passage)	3 641	<u>29 125</u>	228
IPNV-He (11. Passage)	14 562	102	<u>58 251</u>

Tabelle 7

R-Werte, errechnet aus Tabelle 6 nach der Formel von ARCHETTI und HORSFALL (1950)

Virus	Antiserum gegenüber		
	IPNV-Sp	IPNV-Ab	IPNV-He
IPNV-Sp (5. Passage)	<u>1</u>	0,03	0,02
IPNV-Sp (11. Passage)	<u>1</u>	0,02	0,04
IPNV-Ab (3. Passage)	0,03	<u>1</u>	0
IPNV-He (11. Passage)	0,02	0	<u>1</u>

2.2 Biologische Eigenschaften der IPNV-Subtypen Sp, Ab, He

2.2.1 Plaquesgrößen

IPNV-Subtyp Sp (11. Passage) produzierte einheitlich kleine Plaques (Mittelwert der Plaquesgrößen: $0,235 \pm 0,086$ mm). Die Plaquesgrößen streuten hier zwischen $\leq 0,13$ mm bis $0,52$ mm im Durchmesser. Die Plaquesgrößen des IPNV-Subtyp Sp (5. Passage) (Mittelwert der Plaquesdurchmesser: $0,43 \pm 0,192$ mm) und die des IPNV-Subtyp Ab (3. Passage) (Mittelwert der Plaquesdurchmesser $0,32 \pm 0,153$ mm) variierten dagegen zwischen $\leq 0,13$ mm und $0,91$ mm. 76,1 % (IPNV-Subtyp Sp (5. Passage)) bzw. 94,5 % (IPNV-Subtyp Ab (3. Passage)) der Plaques erwiesen sich kleiner als $0,52$ mm im Durchmesser. IPNV-Subtyp He (11. Passage) stellte die größten Plaques (Mittelwert der Plaquesgrößen: $0,527 \pm 0,316$ mm). 47,64 % der Plaques waren größer als $0,91$ mm, und es wurden Durchmesser bis $1,3$ mm gemessen.

Im weiteren Text werden die Plaques mit einem Durchmesser von $\leq 0,52$ mm als "klein", die mit einem Durchmesser von $> 0,52$ mm als "groß" bezeichnet.

Die Plaquesgrößenverteilung des IPNV-Subtyp Sp (656 Grub, 5. Passage), IPNV-Subtyp Sp (656 Grub, 11. Passage), IPNV-Subtyp Ab (Weymouth, 3. Passage) und des IPNV-Subtyp He (Laborisolat, 11. Passage) ist in Abbildung 1 dargestellt.

Eine zeitlich unterschiedliche Anzucht des IPNV-Subtyps Sp unter identischen Bedingungen ergab keine übereinstimmenden Resultate in der Plaquesgrößenverteilung (Abb. 2).

IPNV-Subtyp Sp und IPNV-Subtyp He entwickelten in der fünften PG-Zellpassage simultan "kleine" und "große" Plaques. 88,5 % der Plaques konnten hierbei den "kleinen Plaques" zugeordnet werden.

Dreimaliges Klonen und Weitervermehrung kleiner ($\leq 0,26$ mm) sowie großer ($> 0,78$ mm) Plaques lieferten wiederum gemischte Plaquesgrößen.

Die Verteilung der Plaquesgrößen nach der dritten Klonung sind in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt.



Abb. 1: Relative Häufigkeit der Plaquesgrößen der IPNV-Subtypen Sp (656 Grub, 5. Pass.), Sp (656 Grub, 11. Pass.), Ab (Weymouth, 3. Pass.) und He (Laborisolat, 11. Pass.)

— IPNV Sp (5. Pass.) - - IPNV Sp (11. Pass.)
 IPNV Ab (3. Pass.) - · - IPNV He (11. Pass.)

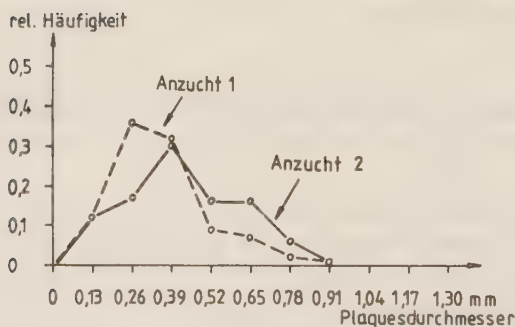


Abb. 2: Relative Häufigkeit der Plaquesgrößen des IPNV-Subtyps Sp (5. Pass.) nach einer zeitlich unterschiedlichen Anzucht unter identischen Bedingungen

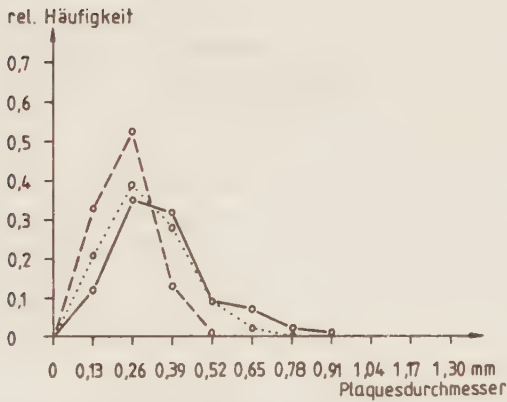


Abb. 3: Die Verteilung der IPNV-Sp-Plaquesgrößen vor und nach dem Klonen und 6maligem Passagieren
 — IPNV-Sp(5. Pass.), vor der Klonung
 --- IPNV-Sp(11. Pass., „klein“), nach den Klonungen
 IPNV-Sp(11. Pass., „groß“), nach den Klonungen

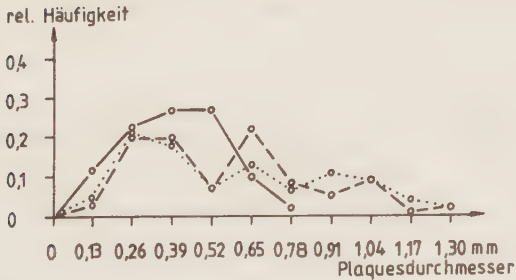


Abb. 4: Die Verteilung der IPNV-He-Plaquesgrößen vor und nach dem Klonen und 6maligem Passagieren
 — IPNV-He(5. Pass.), vor der Klonung
 --- IPNV-He(11. Pass., „klein“), nach den Klonungen
 IPNV-He(11. Pass., „groß“), nach den Klonungen

Die Variante IPNV-Subtyp Sp (11. Passage) "klein" induzierte einheitlich kleine Plaques, deren mittlerer Durchmesser ($0,235 \pm 0,086$ mm) geringer war als der des Originalstammes vor der Klonung und Passagierung ($0,296 \pm 0,166$ mm). Die Variante IPNV-Subtyp Sp (11. Passage) "groß" hingegen ergab hinsichtlich der Plaquesgrößen keine signifikanten Abweichungen vom Originalstamm vor der Klonung (Mittelwert der Plaquesdurchmesser: $0,301 \pm 0,131$ mm). Es traten wiederholt "große Plaques" auf (Durchmesser $> 0,52$ mm).

Die Plaquesgrößen des IPNV Subtyps He wichen nach der dreimaligen Klonung (Mittelwert der Plaquesdurchmesser: $0,576 \pm 0,280$; $0,592 \pm 0,316$ mm) wesentlich von den Plaquesgrößen vor der Klonung (Mittelwert der Plaquesgrößen: $0,397 \pm 0,162$) ab. Es war eine generelle Zunahme der Plaquesdurchmesser festzustellen.

2.2.2 Virulenz

Die Infektionsversuche der Forellen mit den verschiedenen Viren ergaben hinsichtlich der pathologisch-anatomischen Veränderungen und der Mortalitätsraten keine einheitlichen Ergebnisse. Nur in Einzelfällen traten etwa ab dem 10. Tag nach der Infektion Umfangsvermehrungen des Vorderbauches ("Erbsenbauch") sowie Dunkelverfärbung der Fische auf. Deutliche Hämorrhagien in der Haut sowie Exophthalmus konnten nur vereinzelt bei den mit IPNV-Subtyp Sp (5. Passage) infizierten Forellen beobachtet werden.

IPNV-Subtyp Sp (5. Passage) verursachte in der zweiten Woche p.i. stark ansteigende Mortalitätsraten, die 5 Wochen p.i. in 50 % gipfelten (Abb. 5).

IPNV-Subtyp Sp (11. Passage) induzierte in der zweiten und dritten Woche p.i. nur einen leichten Anstieg der Sterberaten; diese betrugen 5 Wochen p.i. 19 % und 20 % (Abb. 6).

IPNV-Subtyp Ab (3. Passage) verursachte Mortalitätsraten von 25 % und 29 % (Abb. 7).

IPNV-Subtyp He (11. Passage) erwies sich dagegen als avirulent für die Forellenbrut (Abb. 8).

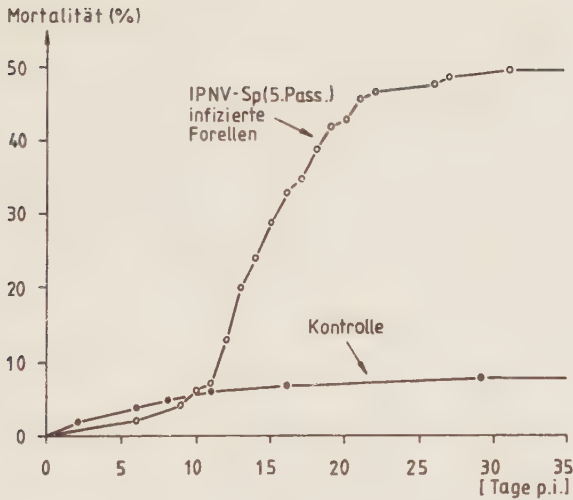


Abb.5: Kumulative Mortalität der mit IPNV-Subtyp Sp(5.Pass.) infizierten Forellen(0,1-0,2g) und der Kontrolle

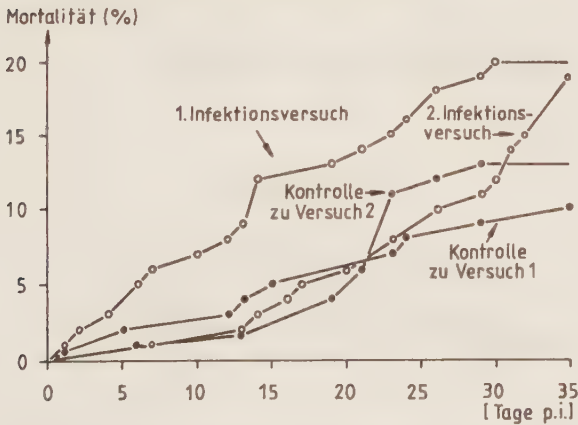


Abb.6: Kumulative Mortalität der mit IPNV-Subtyp Sp (11. Pass.) infizierten Forellen(0,1-0,2g) 2 Infektionsversuche mit Kontrollen

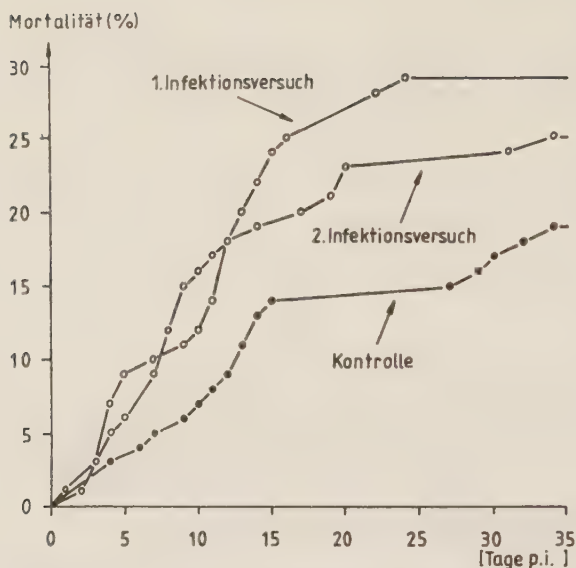


Abb.7: Kumulative Mortalität der mit IPNV-Subtyp Ab (3. Pass.) infizierten Forellen (0,1-0,2 g) [2 Infektionsversuche mit Kontrolle]

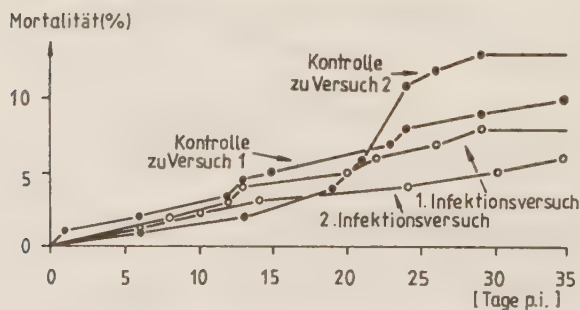


Abb.8: Kumulative Mortalität der mit IPNV-Subtyp He (11. Pass.) infizierten Forellen (0,1-0,2 g) [2 Infektionsversuche mit Kontrollen]

Aus den gestorbenen Forellen sowie aus den 6 Wochen p.i. getöteten Tieren konnten die Erreger mit unterschiedlichem Erfolg reisoliert werden (Tab. 8). Regelmäßig wurde IPNV-Subtyp Sp (5. Passage) ab der zweiten Woche in den Fischen mit einem maximalen Virustiter von $1,72 \times 10^7$ PFU/0,1 g Organpool nachgewiesen. Ab der vierten Woche p.i. konnte auch das IPNV-Subtyp Sp (11. Passage) reisoliert werden (maximaler Virustiter: $1,5 \times 10^6$ PFU/0,1 g Organpool). Die Reisolierung des IPNV-Subtyps He (2 Wochen p.i.) ergab erst nach einer Blindpassage einen positiven Virusbefund. Nur IPNV-Subtyp Ab konnte bereits eine Woche p.i. nachgewiesen werden (3×10^1 PFU/0,1 g), nach diesem Zeitpunkt waren dagegen die Fische virusnegativ.

Tabelle 8

Reisolierung der IPN-Viren 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Wochen p.i.

IPNV-Subtyp	Wochen p. i.					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
	Virustiter (PFU/0,1 g Organpool)					
Sp (5.P.)	0	$1,72 \times 10^7$	6×10^6	$3,96 \times 10^6$	$5,19 \times 10^5$	$3,9 \times 10^2$
Sp (11.P.)	0	0	0	$9,3 \times 10^4$	$1,78 \times 10^2$	$1,5 \times 10^6$
Ab (3.P.)	3×10^1	0	0	0	0	0
He (11.P.)	0	+	0	0	0	0
Kontrollen	0	0	0	0	0	0

+ = erst nach einer Blindpassage viruspositiv

Die Versuche wurden in vier verschiedenen Ansätzen durchgeführt. Die hieraus resultierenden unterschiedlichen hälterungsbedingten Sterberaten bei den Kontrollfischen betrugen 19 % (Infektionsversuch mit IPNV-Subtyp Ab (3. Passage)), 10% (Infektionsversuche mit IPNV-Subtypen Sp und He (jeweils 11. Passage)) und 8 % (Infektionsversuch mit IPNV-Subtyp Sp (5. Passage)). Diese Werte wurden von den gemittelten Sterberaten der infizierten Fische abgezogen (= Kontrollbereinigte Mortalität; Tab. 9).

Tabelle 9

Kontrollbereinigte Mortalitätsraten der mit den IPNV-Subtypen infizierten Forellen (5 Wochen p.i.).

IPNV-Subtyp	Sp (5.Pass.)	Sp (11.Pass.)	Ab (3.Pass.)	He (11.Pass.)
Mortalität 5 Wochen p.i.	42 %	9 %	8 %	0 %

2.3 Die humorale Immunantwort der experimentell mit den IPNV-Subtypen Sp (5. Passage), Sp (11. Passage), Ab (3. Passage) und He (11. Passage) infizierten (i.p.) Regenbogenforellen (200 q)

Alle experimentell infizierten Fische bildeten virusneutralisierende Antikörper. Die Ausbildung der Antikörpertiter der Seren zeigte einen von der Zeit und vom Antigen abhängigen individuell unterschiedlichen Verlauf.

Wie am Beispiel der mit dem IPNV-Subtyp Sp infizierten Forellen dargestellt (Tab. 10) betrugen die individuellen Titer-Differenzen bis zu 2^6 pro Fisch.

Tabelle 10

Die Einzeltiter der mit IPNV-Subtyp Sp (5. Passage) infizierten Regenbogenforellen (6 Monate p.i..)

Forelle Nr.	1	2	3	4
Antikörper- titer log 2	11,83	6,83	8,83	5,83

2.3.1 IPNV-Subtyp Sp (5. Passage), IPNV-Subtyp Sp (11. Passage)

Die mit IPNV-Subtyp Sp 5. und 11. Passage infizierten Forellen zeigten in den ersten beiden Monaten nach der Infektion einen deutlichen Anstieg der Antikörpertiter von $2^{0,83}$ auf $>2^9$ (hitzeinaktivierte Seren). Es wurden Höchstitter bis zu $2^{12,5}$ innerhalb von 65 Tagen erreicht. Danach persistierte der Antikörpergehalt der Seren mit nahezu gleichbleibenden Titern über 9 Monate (mittlere Titerwerte zwischen $2^{7,83}$ und $2^{10,5}$).

Hinsichtlich der immunogenen Wirkung war kein signifikanter Unterschied zwischen den IPNV-Subtypen Sp 5. und 11. Passage zu ermitteln.

Die einzelnen Titerwerte sind in Abb. 9 dargestellt.

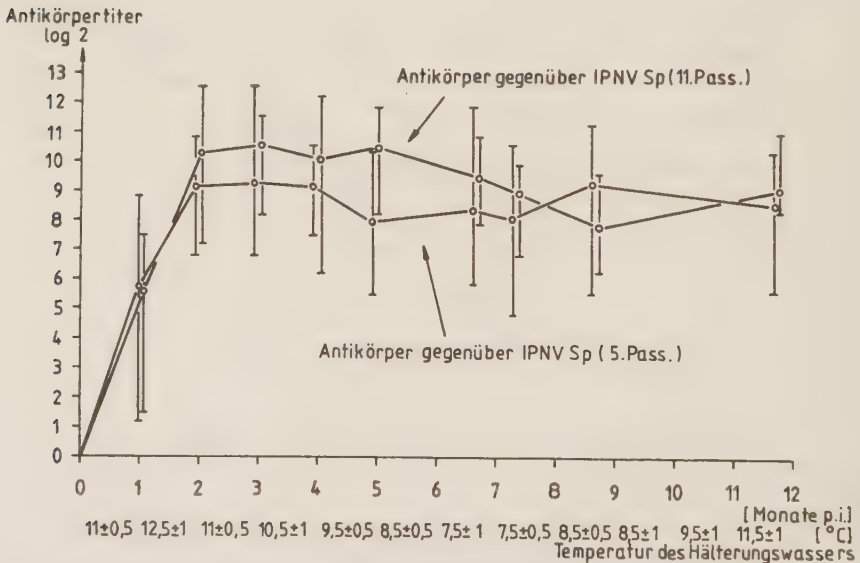


Abb.9: Antikörpergehalt hitzeinaktivierter Seren der mit IPNV-Subtyp Sp (5.Pass.) und IPNV-Subtyp Sp (11.Pass.) infizierten Regenbogenforellen (Mittelwert aus vier Einzelwerten)

2.3.2 IPNV-Subtyp Ab (3. Passage)

Die Seren der mit IPNV-Subtyp Ab infizierten Forellen zeigten innerhalb der ersten 3 Monate einen deutlichen Antikörperanstieg von 2^7 bis $2^{10,5}$ (unbehandelte Seren) bzw. von $2^{0,83}$ auf $2^{7,5}$ (hitzeinaktivierte Seren). Ab dem 4. Monat sank der Antikörpergehalt auf $2^{6,5-2^7}$ (unbehandelte Seren) bzw. 2^2-2^3 (hitzeinaktivierte Seren). Danach blieben die Antikörpertiter weitgehend konstant (Abb. 10).

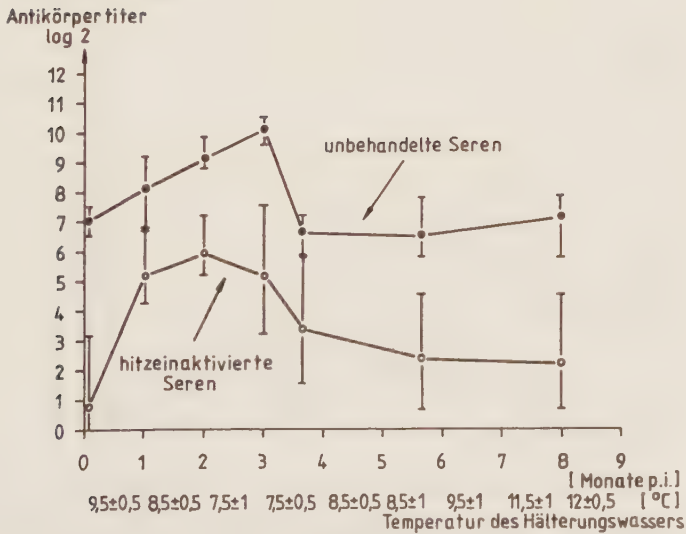


Abb.10: Antikörpergehalt unbehandelter und hitzeinaktiver Seren der mit IPNV-Subtyp Ab(3.Pass.) infizierten Regenbogenforellen (Mittelwert aus vier Einzelwerten)

2.3.3 IPNV-Subtyp He (11. Passage)

Die für die Versuche benutzten Forellen enthielten trotz jahrelanger SPF-Hälterung bereits vor der Infektion IPNV-Subtyp He neutralisierende Antikörper im Serum ($> 2^{10}$ unbehandelte Seren; $2^{4,5}$ hitzeinaktivierte Seren). Nur wenn die Seren hitzeinaktiviert untersucht wurden, konnte ein Ansteigen des Antikörpertiters der Forellenserum nach der Infektion von $2^{4,5}$ auf $2^{8,83}$ während der ersten 5 Monate beobachtet werden (Abb. 11).

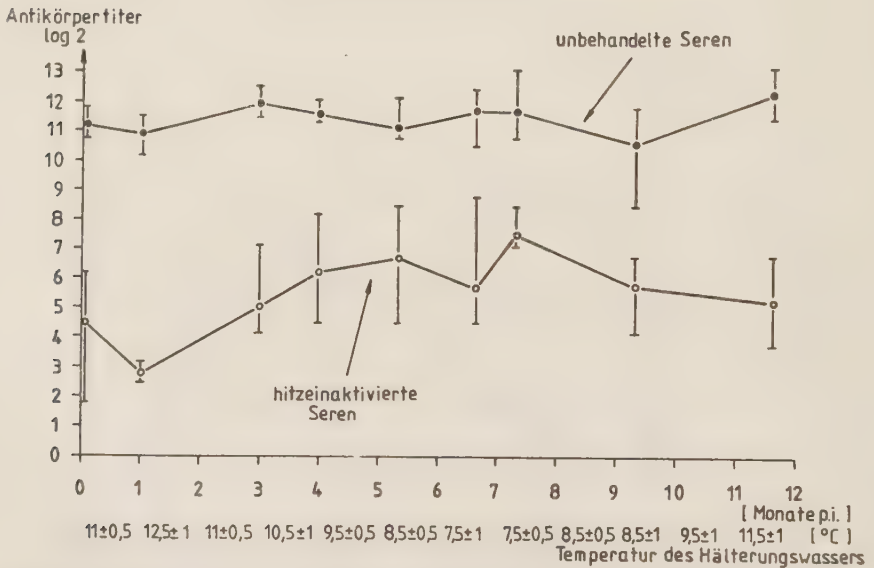


Abb.11: Antikörpergehalt unbehandelter und hitzeinaktiver Seren der mit IPNV-Subtyp He (11. Pass.) infizierten Regenbogenforellen (Mittelwert aus vier Einzelwerten)

2.4 Nachweis von IPNV-Antikörpern in Regenbogenforellenfeldseren aus Zuchtbetrieben mittels des Neutralisationstestes

2.4.1 Antikörper gegenüber IPNV-Subtyp Sp (5. Passage)

63 % der unbehandelten und 51 % der hitzeinaktivierten Seren neutralisierten das IPNV-Subtyp Sp (5. Pass.) mit Titern zwischen $2^{0,83}$ bis $\geq 2^{7,5}$. Die Hitzeinaktivierung der Seren hatte auf die Titerhöhe keinen signifikanten Einfluß (Abb. 12).

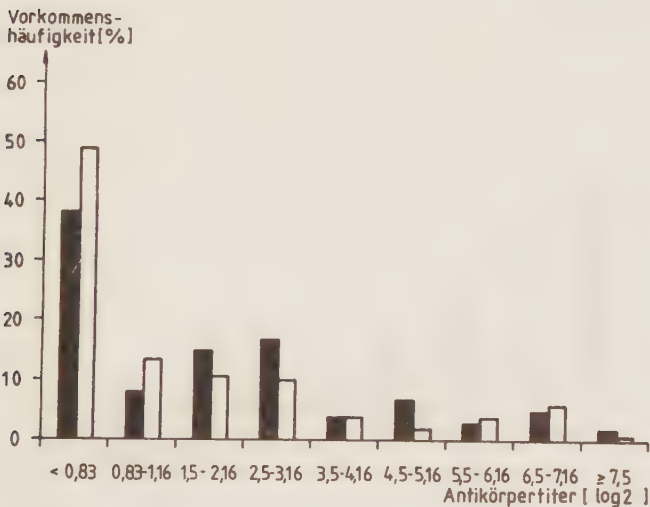


Abb.12 :

IPNV-Subtyp Sp (5.Pass.)-spezifische Antikörpertiter unbehandelter und hitzeinaktivierter Regenbogenforellenser (n=102) aus Zuchtbetrieben

■ unbehandelte Seren

□ hitzeinaktivierte Seren

2.4.2 Antikörper gegenüber IPNV-Subtyp Sp (11. Passage)

72 % der unbehandelten und 54 % der hitzeinaktivierten Seren neutralisierten das IPNV-Subtyp Sp (11. Pass.) mit Titern zwischen $2^{0,83}$ bis $\geq 2^{7,5}$. Die unbehandelten Seren zeigten geringfügig höhere Neutralisationstiter als die hitzeinaktivierten (Abb. 13).

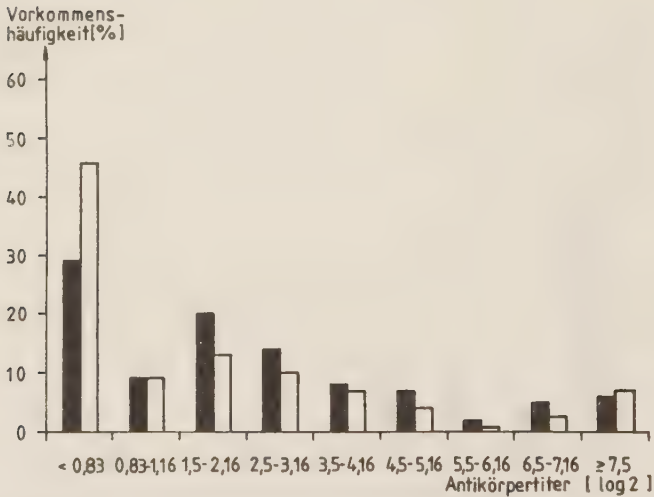


Abb. 13:

IPNV-Subtyp Sp(11.Pass.)-spezifische Antikörpertiter unbehandelter und hitzeinaktivierter Regenbogenforellenserien (n= 102) aus Zuchtbetrieben

■ unbehandelte Seren

□ hitzeinaktivierte Seren

2.4.3 Antikörper gegenüber IPNV-Subtyp Ab (3. Passage)

100 % der unbehandelten und 79 % der hitzeinaktivierten Seren neutralisierten das IPNV-Subtyp Ab (3. Pass.) mit Titern zwischen $2^{0,83}$ bis $\geq 2^{7,5}$. Der Einfluß der Hitzeinaktivierung auf die Neutralisationstiter hatte auf die Höhe der Antikörpertiter einen abgestuften Effekt (Abb. 14).

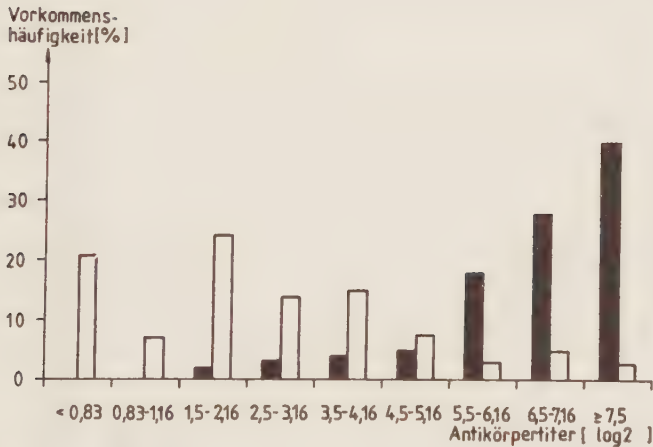


Abb. 14 :

IPNV-Subtyp Ab (3. Pass.)-spezifische Antikörpertiter unbehandelter und hitzeinaktivierter Regenbogenforellenserien (n = 102) aus Zuchtbetrieben

■ unbehandelte Seren

□ hitzeinaktivierte Seren

2.4.4 Antikörper gegenüber IPNV-Subtyp He (11. Passage)

100 % der unbehandelten und 89 % der hitzeinaktivierten Seren neutralisierten das IPNV-Subtyp He (11. Pass.) mit Titern zwischen $2^{0,83}$ bis $\geq 2^{7,5}$. Während die Titer der inaktivierten Seren eine fast gleichmäßige Verteilung in der Titerhöhe zeigten, wiesen 84 % der Seren im unbehandelten Zustand die höchsten Neutralisationstiter von $\geq 2^{7,5}$ auf (Abb. 15).

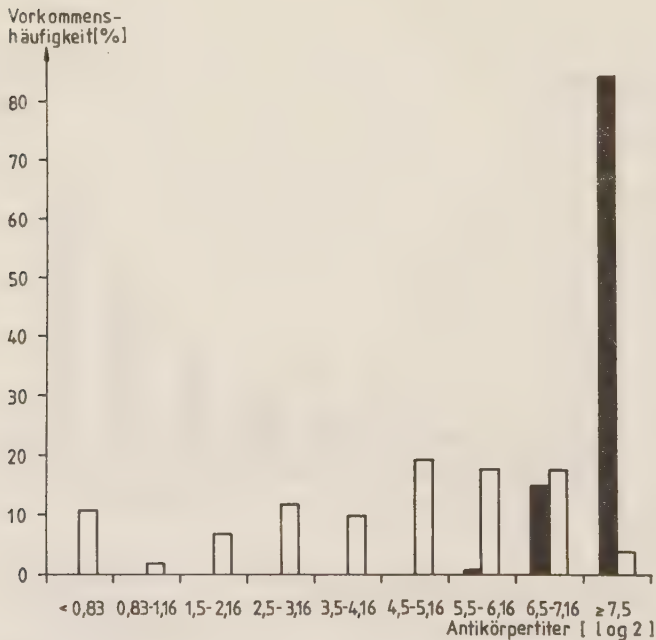


Abb.15:

IPNV-Subtyp He (11.Pass.)-spezifische Antikörpertiter unbehandelter und hitzeinaktivierter Regenbogenforellenser (n=102) aus Zuchtbetrieben

■ unbehandelte Seren

□ hitzeinaktivierte Seren

2.5 IPNV-subtypenspezifische Neutralisation unbehandelter und hitzeinaktivierter Seren von Regenbogenforellen aus verschiedenen Zuchtbetrieben

Insgesamt sind 104 Serumproben aus 24 deutschen und 4 englischen Betrieben untersucht worden. Pro deutschem Forellenzuchtbetrieb wurden die Seren von 4 Regenbogenforellen einzeln auf ihre IPNV-neutralisierenden Eigenschaften überprüft. Hierbei wurden zwar individuelle Unterschiede ermittelt, es waren aber nur in einem Fall alle 4 untersuchten Seren negativ, wenn diese hitzeinaktiviert worden waren. Alle unbehandelten Seren erwiesen sich jedoch als IPNV-positiv. Unter Verwendung des Antigens IPNV-Subtyp Sp (5. Passage) reagierten die Forellenserum aus 5 Betrieben (inaktiviertes Serum) bzw. aus 4 Betrieben (unbehandeltes Serum) negativ. Die Hitzeinaktivierung zeigte hier nur in einem Falle (Betrieb 2) eine Verschiebung von seropositiv zu seronegativ (Tab. 11).

Tabelle 11

Regenbogenforellenserum aus 24 Zuchtbetrieben mit IPNV-Subtyp Sp-, Ab-, He-neutralisierendem Effekt vor und nach der Hitzeinaktivierung
(+ = seropositiv; - = seronegativ)

Seren von Betrieb	unbehandelte Seren				hitzeinaktivierte Seren			
	IPNV-Subtypen Sp (5.P.)	Sp (11.P.)	Ab (3.P.)	He (11.P.)	IPNV-Subtypen Sp (5.P.)	Sp (11.P.)	Ab (3.P.)	He (11.P.)
1	+	+	+	+	-	+	+	-
	-	-	+	+	-	-	+	-
	-	-	+	+	-	-	+	-
	+	+	+	+	-	-	-	-
2	+	+	+	+	-	-	-	-
	+	+	+	+	-	-	-	-
	+	+	+	+	-	-	-	-
	+	+	+	+	-	-	-	-
3	-	+	+	+	-	-	+	+
	-	+	+	+	-	-	+	+
	-	+	+	+	-	-	+	+
	-	+	+	+	-	-	+	+
4	-	-	+	+	-	-	+	+
	+	+	+	+	-	+	+	+
	-	-	+	+	-	-	+	+
	+	-	+	+	-	-	+	+

Serien von Betrieb	unbehandelte Serien				hitzeinaktivierte Serien			
	Sp (5.P.)	IPNV-Subtypen Sp (11.P.)	Ab (3.P.)	He (11.P.)	Sp (5.P.)	IPNV-Subtypen Sp (11.P.)	Ab (3.P.)	He (11.P.)
5	+	+	+	+	+	+	-	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	-	+	+	-	-	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	+	+	-	-	-	+
	-	-	+	+	-	-	-	-
	-	+	+	+	-	-	-	+
	-	+	+	+	-	-	-	+
7	+	+	+	+	+	-	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	-	+
	+	+	+	+	+	-	+	+
8	+	+	+	+	-	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
9	-	+	+	+	-	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	-	-	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	-	+	+	-	-	+	+
	+	+	+	+	+	+	-	+
	+	+	+	+	-	+	-	+
11	+	+	+	+	+	+	-	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	-	+
12	-	-	+	+	-	-	+	+
	-	-	+	+	-	-	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	-	-	-	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	-	+	+

Seren von Betrieb	unbehandelte Seren				hitzeinaktivierte Seren			
	IPNV-Subtypen Sp (5.P.)	Sp (11.P.)	Ab (3.P.)	He (11.P.)	IPNV-Subtypen Sp (5.P.)	Sp (11.P.)	Ab (3.P.)	He (11.P.)
15	-	-	+	+	-	-	+	-
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	-	+
	-	-	+	+	-	-	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	-	+
	+	+	+	+	+	+	-	+
	+	+	+	+	+	+	-	+
17	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	-	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	-	+	+	+
18	-	+	+	+	-	-	-	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
19	-	+	+	+	+	+	+	+
	-	-	+	+	-	-	+	+
	-	-	+	+	-	-	+	+
	-	-	+	+	-	-	+	+
20	+	+	+	+	-	-	+	+
	+	-	+	+	-	-	+	+
	-	-	+	+	-	-	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
21	-	-	+	+	+	-	+	+
	-	-	+	+	-	-	+	+
	-	-	+	+	-	-	+	+
	-	-	+	+	-	-	+	+
22	-	-	+	+	-	+	+	+
	-	-	+	+	-	-	+	-
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	-	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	-	-	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
24	-	+	+	+	-	-	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+

83 - 100 % (unbehandelte Seren) bzw. 79 - 92 % (hitzeinaktivierte Seren) der untersuchten deutschen Betriebe waren IPNV-seropositiv (Tab. 12).

Tabelle 12

Zusammenstellung der untersuchten deutschen Forellenzuchtbetriebe mit seropositiven Forellen

A = unbehandelte Seren; B = hitzeinaktivierte Seren

Serum	IPNV-Subtyp Sp		IPNV-Subtyp Ab	IPNV-Subtyp He
	5. Pass.	11. Pass.	3. Pass.	11. Pass.
Betriebe mit positiven Forellenserien				
A	20 (83 %)	23 (96 %)	24 (100 %)	24 (100 %)
B	19 (79 %)	20 (83 %)	22 (92 %)	22 (92 %)

2.5.1 Neutralisation des IPNV-Subtyps Sp (5. Passage)

IPNV-Subtyp Sp (5. Passage) wurde von Forellenserien im unbehandelten Zustand aus 20 deutschen Betrieben (83 %) bzw. im hitzeinaktivierten Zustand von Forellenserien aus 19 deutschen Betrieben (79 %) neutralisiert. In 3 Fällen war infolge der Hitzeinaktivierung eine völlige Neutralisationstiterreduzierung zu beobachten. Im allgemeinen hatte jedoch die Hitzeinaktivierung der Seren auf die Titerhöhen nur einen geringfügigen Einfluß.

Die aus England stammenden Seren zeigten bei zwei Betrieben sowohl im unbehandelten als auch im hitzeinaktivierten Zustand annähernd gleiche Neutralisationstiter (Tab. 13).

2.5.2 Neutralisation des IPNV-Subtyps Sp (11. Passage)

IPNV-Subtyp Sp (11. Passage) wurde von Forellenserien aus 23 deutschen Betrieben (96 %) im unbehandelten Zustand und aus 20 deutschen Betrieben (83 %) nach Hitzeinaktivierung neutralisiert (Tab. 12). Gegenüber dem 5x zellkulturpassagierten IPNV-Sp war bei Verwendung des 11 x passagierten Virus eine geringfügige Neutralisationstiterzunahme festzustellen. Außerdem neutralisierten 3 Seren (unbehandelt) bzw. 2 Seren (hitzeinaktiviert) das IPNV der 11. Passage, während das IPNV der 5. Passage in diesen Fällen nicht neutralisiert worden war.

Die Seren von zwei englischen Betrieben neutralisierten mit annähernd gleichen Titern sowohl im unbehandelten als auch im hitzeinaktivierten Zustand den IPNV-Subtyp Sp (11. Passage). Auch hier war eine Titerzunahme gegenüber dem IPNV-Subtyp Sp (5. Passage) festzustellen.

Die einzelnen Titerwerte sind in Tabelle 13 angegeben.

2.5.3 Neutralisation des IPNV-Subtyps Ab (3. Passage)

IPNV-Subtyp Ab (3. Passage) wurde von Forellenserien aus allen 24 untersuchten deutschen Betrieben (100 %) im unbehandelten Zustand mit hohen Titern ($2^{3,91}$ - $2^{7,38}$) neutralisiert. Hitzeinaktivierung der Seren reduzierte in 2 Fällen (Neutralisationstiter vor der Behandlung der Seren $2^{5,74}$; $2^{6,16}$) die virusneutralisierenden Eigenschaften der Seren völlig. Im allgemeinen waren die Neutralisationstiter der unbehandelten Seren signifikant höher als die Neutralisationstiter der Seren nach der Hitzebehandlung.

Die Seren aller untersuchten englischen Betriebe neutralisierten das IPNV-Subtyp Ab (3. Passage) sowohl im unbehandelten als auch im hitzeinaktivierten Zustand. Auch hier hatte die Hitzeinaktivierung eine Titerreduzierung zur Folge (Tab. 13).

2.5.4 Neutralisation des IPNV-Subtyps He (11. Passage)

IPNV-Subtyp He (11. Passage wurde von allen Seren (unbehandelter Zustand) der Forellen aus den 24 deutschen untersuchten Betrieben (100 %) mit hohen Titern ($2^{6,74} - \geq 2^{7,5}$) neutralisiert. Die Serumaktivierung hatte nur in zwei Fällen eine völlige Titerreduzierung um $2^{7,24}$ bzw. $2^{1,6}$ zur Folge. Auch hier war infolge der Hitzeinaktivierung eine deutliche Reduzierung der Neutralisationstiter zu verzeichnen.

Alle Seren aus englischen Forellenzuchtbetrieben neutralisierten sowohl unbehandelt (Neutralisationstiter $\geq 2^{7,5}$) als auch hitzeinaktiviert das IPNV-Subtyp He (Neutralisationstiter $2^{4,33} - 2^{5,83}$) (Tab. 13).

Tabelle 13:

Die gemittelten antigenspezifischen Neutralisationstiter inaktivierter und nicht inaktivierter Regenbogenforellenserum aus verschiedenen Zuchtbetrieben

Antigen	IPNV Sp (5.P.)		IPNV Sp (11.P.)		IPNV Ab (3.P.)		IPNV He (11.P.)	
Betrieb Nummer	A		S e r e n		A		B	
			A		B		A	
			Neutralisationstiter log 2					
1	1,16	neg	1,41	0,83	6,91	1,62	7,16	neg
2	1,58	neg	1,74	neg	6,16	neg	7,24	neg
3	neg	neg	1,66	neg	6,40	3,58	≥7,5	4,41
4	0,83	neg	0,83	0,83	6,99	3,08	≥7,5	6,16
5	2,12	1,77	2,45	2,22	5,47	1,22	≥7,5	2,83
6	neg	neg	0,83	neg	5,74	neg	7,41	2,7
7	3,08	2,95	3,16	2,16	5,83	0,95	≥7,5	4,33
8	3,49	1,54	4,16	2,58	≥7,5	7,16	7,08	4,66
9	1,95	0,83	3,66	1,79	≥7,5	5,91	≥7,5	2,74
10	2,87	1,75	2,78	1,95	6,41	0,83	7,41	4,83
11	4,16	4,41	5,49	5,33	6,47	2,58	≥7,5	4,99
12	0,83	0,83	1,24	0,83	6,74	1,79	≥7,5	5,41
13	4,08	4,41	4,41	4,83	7,33	3,24	≥7,5	7,33
14	3,41	2,83	3,49	2,62	7,08	3,49	≥7,5	5,33
15	3,58	3,24	3,75	3,75	4,66	1,12	≥7,5	2,87
16	3,33	3,74	3,41	4,08	6,41	0,83	≥7,5	1,83
17	2,16	2,29	2,45	2,83	6,83	2,24	≥7,5	5,49
18	3,62	2,04	4,66	3,04	7,33	2,45	≥7,5	5,66
19	neg	0,83	0,83	0,83	≥7,5	4,33	≥7,5	6,16
20	1,37	0,83	1,08	0,95	7,33	3,58	≥7,5	5,41
21	neg	0,83	neg	neg	5,83	3,24	6,74	5,91
22	0,91	0,83	1,24	0,91	5,41	2,99	6,74	1,62
23	2,12	1,7	2,91	1,75	3,91	2,25	≥7,5	5,49
24	2,22	1,22	3,05	1,33	7,38	1,61	≥7,5	5,45
E-1	2,41	2,58	3,58	2,91	5,0	1,25	≥7,5	4,33
E-2	1,91	1,75	2,08	2,25	7,0	3,99	≥7,5	4,33
E-3	neg	neg	neg	neg	6,5	4,16	≥7,5	5,83
E-4	neg	neg	neg	neg	6,33	2,49	≥7,5	5,16
K	0,83	neg	0,98	neg	7,12	1,04	≥7,5	5,54

A = unbehandelte Seren; B = hitzeinaktivierte Seren

E = Seren aus vier ausländischen Betrieben (England)

K = Neutralisationstiter der Seren, die von unter Spf-Bedingungen gehaltenen Regenbogenforellen abstammten.

2.6 IPNV-subtypenspezifische Neutralisation unbehandelter und hitzeinaktivierter Regenbogenforellenserum aus Wildgewässern

Alle 4 untersuchten Seren neutralisierten sowohl IPNV-Subtyp Ab als auch IPNV-Subtyp He mit relativ hohen Titern ($2^{5,16} - \geq 2^{7,5}$) im unbehandelten Zustand und mit entsprechend geringeren Titern ($2^{0,83} - 2^{7,16}$) nach der Hitzeinaktivierung. Nur 1 Serum zeigte eine positive Reaktion mit IPNV-Subtyp Sp. Die einzelnen Titerwerte sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14

IPNV-Neutralisationstiter (log2) der aus Wildgewässern stammenden Regenbogenforellenserum (A = unbehandelte Seren, B = hitzeinaktivierte Seren)

Fisch	IPNV-Subtyp							
	Sp (5. Passage)		Sp (11. Passage)		Ab (3. Passage)		He (11. Passage)	
	A	B	A	B	A	B	A	B
	Neutralisationstiter (log2)							
1	neg.	neg.	neg.	neg.	5,16	1,16	$\geq 7,50$	3,16
2	neg.	neg.	neg.	neg.	5,50	0,83	$\geq 7,50$	3,50
3	neg.	neg.	neg.	neg.	6,83	2,16	$\geq 7,50$	6,50
4	1,16	neg.	1,16	1,50	7,16	3,5	$\geq 7,50$	7,16

2.7 IPNV-subtypenspezifische Neutralisation unbehandelter und hitzeinaktivierter Seren von aus Zuchtbetrieben und Wildgewässern stammenden Bachforellen, Seeforellen und Seesaiblingen

Insgesamt wurden die Seren von 11 Bachforellen, 6 Seeforellen und 5 Seesaiblingen untersucht.

2.7.1 Seren von Bachforellen

9 der untersuchten Seren von Bachforellen neutralisierten den IPNV-Subtyp Sp mit Titern zwischen $2^{0,83}$ und $2^{4,83}$ im unbehandelten Zustand. Nach der Hitzeinaktivierung waren 6 (IPNV-Sp, 5. Passage) bzw. 9 (IPNV-Sp, 11. Passage) der Seren IPNV-Sp positiv. Die Neutralisationstiter lagen zwischen $2^{0,83}$ und $2^{5,16}$.

Mit Titern von $2^{1,16}$ bis $2^{5,83}$ wurde IPNV-Subtyp Ab von 8 unbehandelten und 9 hitzeinaktivierten Seren neutralisiert.

Alle Seren waren IPNV-He positiv. Relativ niedrige Titer von $2^{3,16}$ und $2^{4,83}$ im unbehandelten und $2^{0,83}$, $2^{2,16}$ im hitzeaktivierten Zustand wiesen 2 Seren auf. Titer von $\geq 2^{7,5}$ (unbehandelt) und $2^{3,5}$ - $2^{7,10}$ (hitzeinaktiviert) wurden für die restlichen Seren ermittelt (Tabelle 15).

Tabelle 15:

IPNV-subtypenspezifische Neutralisationstiter (log₂) der
11 Bachforellenserien

Fisch	IPNV Subtyp							
	Sp (5.P.)		Sp (11. P.)		Ab (3. P.)		He (11. P.)	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Neutralisationstiter log ₂								
1	1,5	5,16	1,5	4,83	4,5	4,16	≥ 7,5	5,5
2	1,5	1,5	1,5	2,16	1,5	2,16	≥ 7,5	5,5
3	2,83	neg	2,16	neg	3,5	1,16	≥ 7,5	3,5
4	1,16	2,5	2,16	2,5	1,5	2,5	≥ 7,5	6,83
5	1,5	0,83	1,16	0,83	5,83	neg	≥ 7,5	5,5
6	2,5	2,5	2,83	3,16	neg	2,5	≥ 7,5	7,16
7	neg	neg	neg	0,83	neg	1,5	≥ 7,5	4,83
8	0,83	neg	1,16	0,83	neg	neg	≥ 7,5	6,16
9	1,5	1,5	1,16	1,5	1,5	1,5	4,83	2,16
10	4,5	neg	4,83	1,16	2,16	1,5	3,16	0,83
11	neg	neg	neg	neg	3,16	2,16	≥ 7,5	5,83

A = unbehandelte Seren; B = hitzeinaktivierte Seren

2.7.2 Seren von Seeforellen

Alle untersuchten Seren neutralisierten den IPNV-Subtyp He mit Höchstwerten ($\geq 2^{7,5}$) im unbehandelten Zustand. Nach der Hitzeinaktivierung sank der Neutralisationstiter entsprechend ab ($2^{0,83} - 2^{2,83}$). 3 (unbehandelte) bzw. 2 (hitzeinaktivierte) Seren neutralisierten den IPNV-Subtyp Ab mit relativ geringen Titern ($2^{0,83} - 2^{2,50}$). Ebenso konnten nur 2 IPNV-Subtyp Sp-spezifische Seren ermittelt werden (Neutralisationstiter $2^{0,83} - 2^{1,16}$) (Tab. 16).

Tabelle 16:

IPNV-subtypenspezifische Neutralisationstiter (log 2) der
6 Seeforellenserren

Fisch	IPNV-Subtyp							
	Sp (5.P.)		Sp (11.P.)		Ab (3. P.)		He (11.P.)	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Neutralisationstiter log 2)								
1	neg	1 ⁺ ,5	neg	0 ⁺ ,83	neg	1 ⁺ ,16	$\geq 7,5$	2,5
2	neg	1 ⁺ ,16	neg	1 ⁺ ,16	neg	1 ⁺ ,16	7,16	2,16
3	neg	neg	neg	neg	1,16	neg	$\geq 7,5$	1,16
4	neg	neg	neg	neg	2,5	neg	$\geq 7,5$	0,83
5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	$\geq 7,5$	2,83
6	neg	neg	neg	neg	0,83	neg	$\geq 7,5$	1,5

A = unbehandelte Seren;

B = hitzeinaktivierte Seren

+ = fraglich (wegen Toxizität)

2.7.3 Seren von Seesaiblingen

Alle untersuchten Seren von Seesaiblingen neutralisierten den IPNV-Subtyp He mit hohen Titern ($2^{4,38} - \geq 2^{7,5}$) im unbehandelten und mit geringeren Titern ($2^{1,5} - 2^{4,16}$) im hitzeinaktivierten Zustand. 4 der Seren neutralisierten sowohl den IPNV-Subtyp Ab als auch den IPNV-Subtyp Sp mit Titerwerten zwischen $2^{0,83} - 2^{3,5}$.

Die einzelnen Neutralisationstiter sind in Tab. 17 angegeben.

Tabelle 17:

Neutralisationstiter (log 2) der 5 Seesaiblingsseren

Fisch	IPNV-Subtyp							
	Sp (5. P.)		Sp (11. P.)		Ab (3. P.)		He (11. P.)	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Neutralisationstiter (log 2)								
1 *	2,5	3,16	2,83	3,5	2,5	2,83	4,38	3,5
2 *	3,5	2,5	3,5	3,5	3,5	2,83	7,16	3,5
3 *	1,5	1,16	0,83	1,5	1,83	neg	5,5	1,5
4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	$\geq 7,5$	4,16
5	0,83	1,16	neg	0,83	0,83	1,5	$\geq 7,5$	4,16

A = unbehandelte Seren

B = hitzeinaktivierte Seren

* = Seesaiblinge aus Wildgewässern

2.7.4 IPNV-subtypenspezifische Neutralisation mit Seren von Regenbogenforellen, Seeforellen und Seesaiblingen aus einem Fischzuchtbetrieb

Die Seren von Regenbogenforellen und Seesaiblingen neutralisierten alle IPNV-Subtypen. Dagegen wurden mit Seeforellenserien nur der IPNV-Subtyp Ab und der IPNV-Subtyp He neutralisiert (Tab. 18).

Tabelle 18:

IPNV-spezifische Neutralisationstiter (log 2) (gemittelte Werte) der Seren der Regenbogenforellen, Seeforellen und Seesaiblinge aus einem Fischzuchtbetrieb

Fischart	IPNV-Subtyp							
	Sp (5. P.)		Sp (11. P.)		Ab (3. P.)		He (3. P.)	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Neutralisationstiter								
Regenbogenforellen n = 4	2,12	1,7	2,91	1,7	3,91	2,25	≥ 7,5	5,49
Seeforellen n = 4	neg	neg	neg	neg	1,12	neg	≥ 7,5	1,58
Seesaibling n = 2	0,83	neg	0,83	0,83	0,83	0,83	≥ 7,5	4,16

A = unbehandelte Seren

B = hitzeinaktivierte Seren

2.8 Nachweis spezifischer Antikörper gegenüber den IPNV-Subtypen Sp, Ab, He in Salmonidenserum mittels der indirekten Immunofluoreszenztechnik (IF) und dem Neutralisationstest (NT)

36 Seren wurden mittels der Immunofluoreszenzmethode auf ihre spezifischen Antikörpertiter gegenüber den IPNV-Subtypen Sp, Ab und He untersucht. Die Ergebnisse wurden mit den Werten des Neutralisationstests verglichen.

Es ergab sich eine deutliche Übereinstimmung der spezifischen Neutralisation der einzelnen IPNV-Subtypen zwischen der IF-Methode und dem NT-Test. Die Titerdifferenzen eines Serums gegenüber den IPNV-Subtypen waren bei beiden Methoden ähnlich (Ausnahme: Antigen IPNV-Subtyp He, Serumnummer 13 und 14).

Der Vergleich der mit der IF- bzw. NT-Methode ermittelten Titer zeigt, daß mit der IF-Methode im Durchschnitt höhere Titerwerte als mit dem NT-Test erreicht wurden. Die IF-Methode erwies sich gegenüber der NT-Methode als sensitiver.

Die einzelnen Antikörper sind in der Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19:

Nachweis von spezifischen Antikörpern gegenüber IPNV-Subtypen
mittels des NT-Tests und der IF-Technik

Antigen	Neutralisationstiter (log 2)			Immunofluoreszenztiter (log 2)			Fischart
	IPNV Sp	IPNV Ab	IPNV He	IPNV Sp	IPNV Ab	IPNV He	
Serum							
1	neg	neg	neg	4	neg	4	
2	neg	neg	1	2	1	3	
3	neg	1	neg	neg	2	1	
4	neg	neg	2	2	1	3	
5	1	neg	1	1	neg	4	
6	neg	neg	3	neg	neg	3	
7	neg	neg	3	3	neg	4	
8	1	1	4	5	2	9	
9	neg	neg	5	4	neg	8	
10	neg	1	5	neg	4	8	Regenbogen- forellen aus deutschen Zuchtbetrieben
11	neg	1	5	neg	neg	10	
12	neg	1	5	3	1	6	
13	1	neg	5	neg	neg	neg	
14	1	1	6	neg	neg	neg	
15	1	2	6	5	neg	11	
16	neg	2	4	3	6	7	
17	neg	2	4	1	3	5	
18	2	neg	3	neg	neg	4	
19	neg	3	≥ 7	3	5	11	
20	neg	3	6	4	5	9	
21	1	3	6	neg	neg	10	
22	neg	≥ 7	neg	3	11	4	
23	3	neg	1	5	neg	2	
24	4	neg	1	6	neg	2	
25	5	neg	1	5	neg	2	
26	≥ 7	1	3	11	4	3	
27	≥ 7	neg	4	9	neg	5	
28	≥ 7	4	6	7	neg	10	
29	neg	neg	2	2	3	5	Regenbogen- forellen aus englischen Zuchtbetrieben
30	5	2	5	7	neg	9	
31	neg	2	4	3	4	6	
32	neg	3	4	3	4	5	
33	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Seeforelle
34	neg	neg	1	2	3	neg	Seeforelle
35	1	1	1	3	1	5	Bachforelle
36	1	neg	1	neg	neg	7	Seesaibling

neg = negative Werte



Abb. 16 und Abb. 17

Zytoplasmafluoreszenz IPN-infizierter RTG-2-Zellen nach der Überschichtung mit IPNV-positivem Forellenserum und FITC-kojugiertem Anti-Forellen IG-Immunoglobulin.

IV. Besprechung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die IPNV-Isolate Sp (656 Grub, 5. und 11. Passage), Ab (Weymouth, 3. Passage) und He (Laborisolat, 11. Passage) verwendet. Die subtypenspezifische Identität der Viren konnte durch Kreuz-neutralisationsteste mit Antiseren gegenüber den IPNV-Referenzsubtypen Sp, Ab, He, VR 299 und Te eindeutig geklärt werden. Die in der Literatur beschriebene Gruppenverwandtschaft der einzelnen Subtypen (Ahne, 1985) ist anhand der serologischen Kreuzreaktionen für alle untersuchten Viren ermittelt worden. Nach MAYR et al. (1977) zeigt ein R-Wert von 1 oder höher eine völlige Identität der im Kreuzneutralisationstest untersuchten Viren. Je niedriger die R-Werte liegen, um so geringer ist aber der Verwandtschaftsgrad. Dieser ist im Falle der getesteten IPNV-Subtypen äußerst gering, wie die R-Werte (0-0,4) erkennen lassen.

Die Ergebnisse der Plaquesgrößenvermessung und die der Virulenzbestimmung ermöglichten eine Differenzierung der IPNV-Subtypen. Einheitlich kleine Plaques sowie eine geringe Virulenz (9,4 % Mortalität) kennzeichneten den IPNV-Subtyp Sp (11. Passage). Das Auftreten großer und kleiner Plaques war für die restlichen Subtypen charakteristisch, wobei IPNV-Subtyp Sp (5. Pass.) virulent (42 % Mortalität), IPNV-Subtyp Ab (3. Pass.) gering virulent (8 %) und IPNV-Subtyp He (11. Pass.) avirulent waren. Veröffentlichungen von DORSON et al. (1975) weisen darauf hin, daß frisch isolierte virulente IPNV Sp-Isolate einheitlich kleine Plaques bilden. Durch eine 7malige Zellkulturpassage sind die Isolate avirulent geworden und verursachten große und kleine Plaques. Diese Ergebnisse konnten zumindest für die Plaquesgrößen des IPNV-Subtyps Sp nicht bestätigt werden, weil auch große Plaques verursachende Viren eine hohe Virulenz aufwiesen. Untersuchungen von HILL (pers. Mitt.) ergaben ebenfalls keine Korrelation von Plaquesgröße und Virulenzgrad der IPN-Viren.

Durch die Zelladaptation können bestimmte Eigenschaften eines IPN-Virus, wie z.B. die optimale Vermehrungstemperatur, verändert werden.

So hat DORSON et al. (1978) festgestellt, daß RTG-2-zellkulturadaptierte und frisch aus erkrankter Brut isolierte IPNV Sp-Subtypen eine unterschiedliche optimale Vermehrungstemperatur aufweisen (Supra-optimale Vermehrungstemperaturen: 18-19° C, frisch isolierter Subtyp; 19-20° C RTG-2-zellkulturadaptierter Subtyp). Die Gefrierstabilität, die Empfindlichkeit gegenüber basischen pH-Werten sowie die immunogenen Eigenschaften des Erregers veränderten sich ebenfalls (Hill und Dixon, 1977). SCHERRER und COHEN (1975) selektierten nach der Anzucht des RTG-2-zellkulturadaptierten IPNV-Subtyps VR 299 in FHM-Zellen eine Virusvariante, die signifikante Unterschiede zum Ursprungsvirus aufwies. Das FHM-adaptierte Virus bildete sowohl in RTG-2 als auch in FHM-Zellkulturen Plaques, während das RTG-2-adaptierte Virus nur in RTG-2-Zellkulturen Plaques erzeugte. Die diesen Änderungen zugrunde liegenden Vorgänge sind noch ungeklärt. Nicht übereinstimmende Vermehrungstemperaturen sowie die unterschiedliche Vermehrungsfähigkeit der Subtypen in den Zellen können als Ursache für die Plaquesgrößenunterschiede in Betracht gezogen werden.

Wie aus eigenen Untersuchungen hervorgeht, ist die Plaquesgröße keine stabile Eigenschaft der IPN-Viren. Dies ist aus der Anzucht des IPNV-Subtyps Sp (5. Pass.) zu verschiedenen Zeiten unter identischen Versuchsbedingungen erkennbar. Geklonte große ($>0,78$ mm) bzw. kleine ($\leq 0,26$ mm) Plaques ergaben jeweils wieder gemischte Plaquestypen. DORSON et al. (1978) und HILL (pers. Mitt.) haben ebenfalls festgestellt, daß die Plaquesgrößen keine stabilen Eigenschaften der IPN-Viren sind.

Die Virulenzversuche mit Forellenbrut (0,1-0,2 g) ergaben keine vergleichbaren Mortalitätsraten. Individuell bedingte unterschiedliche Reaktionen der Fische auf die Virusinfektion könnten die Ursache hierfür sein. Ob hierbei genetische Faktoren oder unspezifische Resistenzmechanismen eine Rolle spielen ist ungeklärt. Wahrscheinlich haben auch die Dominanzverhältnisse der Fische untereinander, die Streßsituationen erzeugen, auf die Immunantwort der Fische einen Einfluß (DORSON, 1984).

Alle untersuchten adulten Regenbogenforellen (200 g) reagierten auf die i.p.-Verimpfung der IPNV-Subtypen Sp (5. und 11. Pass.), Ab (3. Pass.) und He (11. Pass.) mit der Bildung humoraler Antikörper. Die ermittelten, individuellen Schwankungen in der Immunantwort der Forellen gegenüber IPNV stehen in Einklang mit Beobachtungen von WOLF und QUIMBY (1969), FRANTSI und SAVAN (1971a) und HILL (pers. Mitt.). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß auch die meisten physiologischen Parameter (z.B. der Hämatokrit) bei Fischen ebenfalls individuell variieren (Dorson, 1984). Die Ursachen hierzu sind noch ungeklärt.

Die Bildung virusneutralisierender Antikörper gegenüber IPNV konnte über einen längeren Zeitraum (51 Wochen) hinweg verfolgt werden. Vergleichbare Untersuchungen führten JØRGENSEN (1973) mit IPNV-Subtyp Sp-, sowie AGNIEL (1975) mit IPNV-Subtyp VR 299-infizierten Forellen durch, wobei die nicht-hitzeinaktivierten Seren übereinstimmend ansteigende Titer bis zum dritten Monat p.i. zeigten; danach sanken diese innerhalb eines Monats wieder ab.

Die mit den IPNV-Subtypen Ab und He infizierten Forellen wiesen bereits vor der Infektion meßbare Antikörpertiter auf. Es liegt die Vermutung nahe, daß die als IPNV-Subtyp Sp-"Spezific pathogen free (SPF)" bezeichneten Fische mit den IPNV-Subtypen Ab und He bereits Kontakt hatten.

Die Seren der mit dem IPNV-Subtyp Sp (5. und 11. Pass.)-infizierten Forellen ließen einen Anstieg der humoralen Antikörpern mit Maximaltitern von $2^{12,5}$ bis zum 65. Tag erkennen. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von JØRGENSEN (1973) und AGNIEL (1975) war anschließend kein deutlicher Titerrückgang zu verzeichnen. Einzeltiter bis zu $2^{11,5}$ wurden auch noch 51 Wochen p.i. ermittelt. Eine permanente Virusvermehrung in den für Antikörper möglicherweise unzugänglichen Organen (z.B. Gehirn, Ovarien, Hoden) könnte als Ursache für die ständige Antikörperproduktion in Betracht kommen (Dorson, 1984).

Die Anzahl der Zellkulturpassagen bedingte zwar eine unterschiedliche Virulenz der Subtypen Sp (5. Pass.) und Sp (11. Pass.), hatte aber auf die Immunantwort der Forellen keinen Einfluß.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den von HILL und DIXON (1977) gemachten Erfahrungen, wonach avirulente IPNV-Subtypen weniger immunogen als virulente IPNV-Subtypen sein sollen.

Die Serumantikörper der mit dem IPNV-Subtyp Ab-infizierten Forellen zeigten den von JØRGENSEN (1973) und AGNIEL (1975) beschriebenen Titerverlauf. Höchstititer von $2^{10,5}$ (unbehandelte Seren) und $2^{7,5}$ (hitzeinaktivierte Seren) wurden nach drei Monaten gemessen. Die hohen Antikörpertiter der unbehandelten Forellenserum lassen auf das Vorhandensein einer, der unspezifischen Immunreaktion zugeordneten, hitzelabilen Komponente (z.B. Komplement) schließen. Die in der Literatur erwähnte unspezifische Virusinaktivierung durch den 6S-Faktor (Dorson et al., 1975, 1978) scheint hier nicht anwendbar, da in den ersten drei Monaten ein deutlicher Anstieg der Antikörpertiter in den unbehandelten Seren der Forellen zu verzeichnen war. Ob Komplementfaktoren bei der IPNV-Neutralisation eine Rolle spielen, ist ungeklärt. Eine Beteiligung von Komplement an der Neutralisation von Egtved Virus (VHSV) durch Forellenserum - nicht hingegen durch Kaninchenimmenserum - ist beschrieben worden (Dorson und Torchy, 1979). Im Gegensatz hierzu spielt Komplement eine wichtige Rolle bei der Neutralisation des Pike Fry Rhabdovirus (PFR) durch Kaninchenimmenserum (Clerx et al., 1978). Diese Befunde treten auch bei anderen behüllten Tierviren, z.B. den Toga-, Herpes- und Coronaviren auf (Almeida und Waterson, 1964; Ashe und Notkins, 1967; Horzinek, 1973).

Trotz der geringen Virulenz des IPNV-Subtyps Ab wurde eine deutliche, wenn auch im Vergleich zum IPNV-Subtyp Sp geringere, Immunantwort der Forellen nachgewiesen. Beobachtungen von HILL und DIXON (1977) bei Forellenbrut, wonach die immunogene Wirkung des IPNV an den Virulenzfaktor gebunden zu sein scheint, konnten, zumindest für adulte Fische, nicht bestätigt werden.

Die unbehandelten Seren der mit dem IPNV-Subtyp He-infizierten Forellen zeigten gleichmäßig hohe virusneutralisierende Titer ($> 2^{10}$). Diese Tatsache könnte in der Sensitivität des IPNV-Subtyps He gegenüber nichtspezifischen, hitzelabilen Serumfaktoren begründet sein. Nach ELLIS und SCHLOTTFELDT (1985) haben die nichtspezifischen Serumfaktoren ein weit größeres Wirkungsspektrum als die spezifischen Antikörper. Diesen Serumfaktoren wird die Möglichkeit der Komplementaktivierung zugesprochen. Über die Natur dieser Faktoren ist wenig bekannt.

Festzustellen bleibt, daß alle untersuchten Seren, unabhängig davon, ob die Fische mit einem virulenten, gering virulenten oder avirulenten IPNV-Virus infiziert worden waren, auch nach 51 Wochen noch Antikörper aufwiesen.

Die Untersuchung von 102 Regenbogenforellenserien aus deutschen Zuchtbetrieben läßt ein überraschend häufiges Vorkommen von IPNV-neutralisierenden Antikörpern in den Seren erkennen.

51 % (IPNV Subtyp Sp, 5. Pass.) bzw. 54 % (IPNV Subtyp Sp, 11. Pass.) der hitzeinaktivierten Seren wiesen Antikörper gegenüber IPNV-Subtyp Sp; 79 % gegenüber IPNV-Subtyp Ab und 89 % gegenüber IPNV-Subtyp He auf. Die Befunde sind aufgrund der beobachteten geringen Kreuzreaktionen zwischen den IPNV-Subtypen als subtypenspezifisch anzusehen.

Die Hitzebehandlung (30 Min., 56° C) reduzierte sowohl bei den Seren experimentell infizierter Forellen als auch bei den Feldseren die virusneutralisierenden Aktivitäten. Nur geringfügige Titerverluste traten im Falle des IPNV-Subtyps Sp auf. Signifikante Titerdifferenzen vor und nach der

Hitzeinaktivierung waren hier nicht feststellbar, so daß auch die Antikörpertiter der unbehandelten Seren als spezifisch betrachtet werden können. 63 % bzw. 72 % der untersuchten Feldseren sind demnach als IPNV-Subtyp Sp-positiv zu werten.

Durch die Hitzeinaktivierung der Seren erfolgte keine generelle Aufhebung der neutralisierenden Aktivität der Seren gegenüber den IPNV-Subtypen. Nur bei einigen Seren wurde zu einem gewissen Prozentsatz (IPNV-Ab bis zu 20 %; IPNV-Sp bis zu 18 %; IPNV-He bis zu 16 %) die virusneutralisierende Aktivität der Seren durch die Hitzeinaktivierung aufgehoben. Eine unterschiedliche Beteiligung hitzelabiler Faktoren (6S-Faktor, Komplement) bei der IPNV-Neutralisation könnte möglicherweise einen Einfluß haben (Dorson et al., 1975, 1978; Dorson und Torchy, 1979).

Bei der Untersuchung auf die Präsenz von Serumantikörpern gegenüber IPNV-Subtyp Sp waren 51 % der untersuchten Seren positiv. Das Auftreten IPNV-Subtyp Sp-positiver Seren bei Regenbogenforellen wird durch Arbeiten von WIZIGMANN et al. (1983b) bestätigt, wo 34 % von 821 untersuchten Forellenserren aus Betrieben als IPNV-Subtyp Sp-positiv ermittelt worden waren. Wurde auch auf Antikörper gegenüber den Subtypen Ab und He untersucht, so erwiesen sich 96 % der untersuchten Seren als IPNV-seropositiv. Seroepizootiologische Untersuchungen sollten daher, um eine Virusfreiheit bestätigen zu können, nicht nur mit einem Subtypen - dem IPNV-Subtyp Sp -, sondern mit den in Deutschland vorkommenden IPNV-Subtypen (Sp, Ab, He) durchgeführt werden.

Die Untersuchung von 24 Forellenzuchtbetrieben führte bei einer Probenzahl von nur 4 Seren pro Betrieb zur Ermittlung von 21 IPNV-Subtyp Sp (5. und 11. Passage)-seropositiven Betrieben (87 %). Zusätzliche Untersuchungen auf IPNV-Subtyp Ab-neutralisierende Antikörper ergaben 22 (92 %) und dazu auf IPNV-Subtyp He-neutralisierende Antikörper 23 (96 %) positive Betriebe. Obwohl die Probenzahl für eine statistische Absicherung der Werte ($P = 95 \%$) zu gering war, konnten 96 % der Betriebe als IPNV-seropositiv eingestuft werden. Untersuchungen von WIZIGMANN et al. (1983b) ließen 64 % der untersuchten Betriebe als IPNV-seropositiv erkennen, wobei aber nur auf Antikörper gegenüber IPNV-Subtyp Sp untersucht worden war. Die Seren der vier pro Betrieb untersuchten Regenbogenforellen zeigten unterschiedliche Antikörpertiter. Dies liegt vermutlich in der individuellen Immunantwort begründet. Derartige Titterschwankungen wurden auch bei den experimentell infizierten Fischen beobachtet.

Die Neutralisationstiter der Regenbogenforellenserien aus Wildgewässern gegenüber den IPNV-Subtypen Ab und He waren mit denen der Seren aus Zuchtbetrieben vergleichbar. Der Befund, daß 3 von 4 aus Wildgewässern stammende Regenbogenforellen keine Antikörper gegenüber dem IPNV-Subtyp Sp aufwiesen, hängt vielleicht mit dem Verbreitungsgrad dieses Subtypes in Wildfischpopulationen zusammen.

Außer Regenbogenforellenserien wurden auch die Seren von Bachforellen, Seeforellen und Seesaiblingen untersucht. Alle Seren wiesen Antikörper gegenüber den IPNV-Subtypen Sp, Ab und He auf. Die Antikörpertiter waren allerdings unterschiedlich hoch. Ein Kontakt aller untersuchten Fische mit IPN-Viren hat demnach stattgefunden. Über eine IPNV-spezifische Immunantwort der Bachforellen ist von WOLF und QUIMBY (1969) sowie von YAMAMOTO (1975a) berichtet worden. Die Autoren beobachteten bei Bachforellen geringere IPNV-spezifische Antikörpertiter als bei Regenbogenforellen. Untersuchungen über das Vorkommen IPNV-spezifischer humoraler Antikörper bei Bachforellen, Seeforellen und Seesaiblinge sind bisher in Deutschland nicht durchgeführt worden. DANGSCHAT und PFEIL-PUTZIEN (1978) sowie WIZIGMANN et al. (1983b)

berichten über den Nachweis des IPNV bei Bachforellen aus Teichwirtschaften und aus Wildgewässern mittels der Erregerisolierung. Berichte über eine IPNV-Isolierung aus Seesaiblingen liegen aus Schweden (Ljungberg und Jørgensen, 1972) sowie aus Kanada (MacDonald et al., 1983) vor. Seeforellen sind bisher weder auf IPNV-Antikörper noch auf IPNV-Erregerpräsenz untersucht worden.

Ein Vergleich der IPNV-spezifischen Antikörpertiter der Seren von Regenbogenforellen, Seeforellen und Seesaiblingen eines Zuchtbetriebs zeigte deutliche Unterschiede in der Höhe der Antikörpertiter gegenüber den IPNV-Subtypen Sp, Ab und He. Demnach bilden Regenbogenforellen höhere IPNV-Antikörpertiter als Seesaiblinge aus. Die geringsten Titer wurden bei Seeforellen gefunden. Da hier offenbar eine artspezifische Immunantwort gegenüber IPNV vorliegt, können die Titerwerte der verschiedenen Arten nicht unmittelbar miteinander verglichen werden.

Die Immunofluoreszenzuntersuchungen sind mit dem Ziel durchgeführt worden, die Anwendbarkeit der indirekten Immunofluoreszenztechnik (IF) zum routinemäßigen Nachweis von IPNV-Antikörpern in Forellenseren zu ermitteln. Hierzu wurden Forellenseren sowohl mit der IF-Methode als auch mit dem Neutralisationstest vergleichend untersucht.

In den Seren experimentell sowie natürlich immunisierter Forellen konnten IPNV-spezifische Antikörper mit der IF-Methode nachgewiesen werden. Die Beobachtung von JØRGENSEN (1974b), wo nur in den Seren experimentell nicht aber in den Seren natürlich infizierter Forellen IPNV-spezifische Antikörper ermittelt wurden, konnte nicht bestätigt werden.

Die Übereinstimmung der Ergebnisse der IF-Methode und des NT-Tests bestätigt die spezifische Antigen-Antikörperreaktion des Neutralisationstestes, da das verwendete Anti-Forellen IG-Immunglobulin monospezifisch ist und somit nur mit spezifischen Immunglobulinen reagiert. Unspezifische Reaktionen, wie sie in den NT-Tests auftreten können, werden von dem IF-Test nicht erfaßt.

Die Ergebnisse beider Methoden (IF- und NT-Test) lassen erkennen, daß die indirekte Immunfluoreszenztechnik zum routinemäßigen Nachweis von IPNV-spezifischen Antikörpern in Forellenserum geeignet ist, da

- a) zwischen den drei IPNV-Subtypen deutlich unterschieden werden konnte und die Titerdifferenzen eines Serums gegenüber den IPNV-Subtypen ähnlich denen, der des NT-Tests waren;
- b) der IF-Test sich als sensitiver erwies, was vermutlich auf der Erfassung von defekten Viruspartikeln (DI) beruht;
- c) die IF-Methode schnell und materialsparend durchgeführt werden konnte.

V. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Nachweis (NT-Test, IF-Methode) der IPNV-Subtyp Sp-, Ab- und He-spezifischen humoralen Antikörper in Salmonidenserum (Regenbogenforellen, Bachforellen, Seeforellen, Seesaiblingen) aus Zuchtbetrieben und aus Wildgewässern.

Die Antigene IPNV-Subtyp Sp (5. und 11. Pass.), Ab (3. Pass.) und He (11. Pass.) sind nach Standardmethoden in PG (Pike gonads)-Zellkulturen vermehrt ($10^{6,5}$ - $10^{7,5}$ KID₅₀/0,1 ml) und mit spezifischen Antiseren identifiziert worden.

Als biologische Parameter der verwendeten IPN-Viren wurden die Plaquesgrößen sowie die Virulenz der Erreger ermittelt. Einheitlich kleine ($\leq 0,52$ mm) Plaques und eine geringe Virulenz (9 % Mortalität) kennzeichneten den IPNV-Subtyp Sp (11. Pass.). Große ($> 0,52$ mm) und kleine ($\leq 0,52$ mm) Plaques waren für die anderen Subtypen charakteristisch, wobei IPNV-Subtyp Sp (5. Pass.) virulent (42 % Mortalität), IPNV Subtyp Ab schwach virulent (8 % Mortalität) und IPNV-Subtyp He avirulent waren.

Experimentell infizierte (i.p., $10^{6,5}$ - $10^{7,5}$ KID₅₀/Fisch) adulte Regenbogenforellen (200 g) entwickelten innerhalb von 1-3 Monaten bei Wassertemperaturen von 7,5-12,5° C humorale Antikörper gegenüber den IPNV-Subtypen Sp, Ab und He. Die hitzeinaktivierten Seren (56° C, 30 Min.) wiesen im Neutralisationstest Antikörpertiter bis zu $2^{12,5}$ (Antigen IPNV-Subtyp Sp), $2^{7,5}$ (Antigen IPNV-Subtyp Ab) und $2^{8,5}$ (Antigen IPNV-Subtyp He) auf. Die Serumantikörper persistierten mit unterschiedlichen Titern bis zum Ende des Versuchszeitraumes (51 Wochen p.i.) in den Fischen.

Die Untersuchung der 102 hitzeinaktivierten Regenbogenforellenserum aus Zuchtbetrieben ergab 51 % IPNV-Subtyp Sp-positive, 79 % IPNV-Subtyp Ab-positive und 89 % IPNV-Subtyp He-positive Seren. Insgesamt erwiesen sich 96 % der untersuchten Regenbogenforellenserum aus Zuchtbetrieben als IPNV-seropositiv.

23 der untersuchten 24 Betriebe wiesen IPNV-seropositive Fische auf.

Alle untersuchten Seren der Regenbogenforellen, Bachforellen, Seeforellen und Seesaiblingen aus Wildgewässern waren IPNV-seropositiv.

Die Subtypenspezifität der Fischantikörper gegenüber den IPNV-Subtypen wurde mit der indirekten Immunfluoreszenzmethode unter Zuhilfenahme von monospezifischem konjugierten Anti-Forellen IG-M ermittelt (Zweischichtenimmunofluoreszenz).

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden:

- 1.) Die IPNV-Subtypen verhalten sich hinsichtlich der Plaquegröße und Virulenz nicht einheitlich. Plaquegröße und Virulenz sind keine voneinander abhängigen Größen.
- 2.) Die höchste Virulenz der in Deutschland bisher isolierten IPNV-Subtypen beinhaltet der IPNV-Subtyp Sp, weniger virulent ist der IPNV-Subtyp Ab und IPNV-Subtyp He scheint für Forellen keine Virulenz zu besitzen.
- 3.) Die Verbreitung der IPNV-Subtypen hängt möglicherweise mit der Virulenz der Erreger zusammen, da bei 51 % der untersuchten Fische Antikörper gegenüber dem virulenten IPNV-Subtyp Sp ermittelt wurden; 96 % der Fische wiesen aber Antikörper gegenüber den gering- bzw. avirulenten IPNV-Subtypen Ab und He auf.
- 4.) Die endemische Verbreitung der in Deutschland isolierten Subtypen (Sp, Ab, He) macht es notwendig, auf Antikörper gegenüber alle Subtypen zu untersuchen, um eine IPN-Virusfreiheit bestätigen zu können.
- 5.) Die Verwendung hitzeinaktivierter Seren für den NT-Test und die Benutzung von monospezifischem konjugierten Anti-Forellen IG-M schließt die Beteiligung unspezifischer Serumkomponenten (6S) bei der Antigen-Antikörperreaktion weitgehend aus. Die IF-Methode ist dem NT-Test zum Nachweis von IPNV-Antikörpern in Fischseren hinsichtlich der Sensitivität überlegen.

VI. Summary

Studies on the existence of IPNV-subtypes (Ab, He, Sp) specific antibodies in trout in the Federal Republic of Germany.

This work deals with the detection (NT-test, IFA-methode) of IPNV-subtypes Sp-, Ab- and He-specific antibody in the sera of captative and wild salmonides (rainbow trout, brown trout, lake trout, arctic char).

The IPN viruses subtype Sp (pass. 5 and 11), Ab (pass. 3) and He (pass. 11) were propagated by standard procedures in pike gonads (PG) cell-cultures ($10^{6.5}$ - $10^{7.5}$ TCID₅₀/0,1 ml) and the agents were identified by using IPNV-subtypes-specific antisera.

Biological parameters of the viruses as plaques sizes and virulence were determined. The IPNV-subtype Sp (pass. 11) is characterized by small plaques ($\leq 0,52$ mm) and a low virulence (mortality 9 %). Large ($> 0,52$ mm) and small ($\leq 0,52$ mm) plaques were typical for the other subtypes; the IPNV-subtype Sp (pass. 5) produced mortality rates of 42 %, the IPNV-subtype Ab of 8 %, the IPNV-subtype He proved to be avirulent for rainbow trout.

Experimentally infected (i.p., $10^{6.5}$ - $10^{7.5}$ TCID₅₀/fish adult rainbow trout (200 g) developed humoral antibody against the IPNV-subtypes Sp, Ab and He at a water temperature of 7,5 to 12,5 ° C within 1 to 3 months. In the neutralization test heat inactivated (56° C, 30 min.) sera had a maximal antibody titre of $2^{12,5}$ (IPNV-subtyp Sp); $2^{7,5}$ (IPNV-subtype Ab) and $2^{8,5}$ (IPNV-subtype He). The antibodies persisted in the fish, till the end of the experiments (51 weeks p.i.) with varying titres.

The investigation of 102 captative rainbow trout demonstrated 51 % IPNV-subtype Sp-positive, 79 % IPNV-subtype Ab-positive and 89 % IPNV-subtype He-positive sera. Altogether, 96 % of the heat inactivated sera of captative rainbow trout were positive for IPNV-antibodies.

All sera investigated of wild rainbow trout, brown trout, lake trout and arctic char proved to be seropositive for IPNV.

Fish having antibodies to IPNV could be demonstrated in 23 of the 24 tested fish farms.

The specificity of fish antibodies to the IPNV-subtypes Sp, Ab, He was proved with the indirect IFA-methode using monospecific conjugated anti-trout IG-M ("two layer" immunofluorescence).

Conclusions:

- 1.) The IPNV-subtypes behave different in the plaques size and in the virulence. There is no correlation between plaque size and virulence of the agents.
- 2.) The IPNV-subtype Sp posses the highest virulence of the IPNV-subtypes so far isolated in Germany. The IPNV-subtype Ab shows a low virulence; the IPNV-subtype He is apparently avirulent for trout.
- 3.) The distribution of the IPNV-subtypes might depend on the virulence of the pathogens to rainbow trout. Antibody against the virulent IPNV-subtype Sp was found in 51 % of the examined fish. 96 % of the fish investigated had antibody against the IPNV-subtypes Ab (low virulence) and He (non virulence).
- 4.) Due to the endemic distribution of the IPNV-subtypes the sera should being tested for antibodies against all subtypes so far isolated in Germany. This is in order to certificate an IPNV free status in trout farms.
- 5.) The application of heatinactivated sera of trout in the NT-test and the use of monospecific conjugated anti-trout IG-M excludes the interference of nonspecific factors in the serum with the antigen-antibody reaction. The IFA-methode proved to be more sensitive than the NT-test for the detection of IPNV antibody in fish sera.

VII. Literaturverzeichnis

- AGIUS, C., H. MANGUNWIRYO, R.H. JOHNSON and D.A. SMALL (1982): A more sensitive technique for isolating infectious pancreatic necrosis virus from symptomatic carrier rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson. J. Fish Dis. 5, 285-292.
- AGIUS, C., A. RICHARDSON and W. WALKER (1983): Further observation on the co-cultivation method for isolating infectious pancreatic necrosis virus from asymptomatic carrier rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson. J. Fish Dis. 6, 477-480.
- AGNIEL, L.D., (1975): An assessment of passive transfer of immunity to infectious pancreatic necrosis Virus (IPNV) in trout. M.S. Thesis, The American University, Washington D.C.
- AHNE, W. (1978a): Laboratoriumsdiagnostik fischpathogener Viren. Tierärztl. Umschau 11, 584-594.
- AHNE, W. (1978b): Isolation and characterisation of infectious pancreatic necrosis virus from pike (Esox lucius). Arch. Virol. 58, 65-69.
- AHNE, W. (1979): Fish cell culture: A fibroblastic line (PG) from ovaries of juvenile pike (Esox lucius). In vitro, 15, 839-840.
- AHNE, W. (1980): Vorkommen des Virus der Infektiösen Pankreasnekrose der Forellen (IPN) bei verschiedenen Fischarten. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 93, 14-16.
- AHNE, W. (1981): Serological techniques currently used in fish virology. International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines, Leetown, W.Va., U.S.A., 1981, Develop. biol. Standard. 49, pp. 3-27 (S. Karger, Basel 1981).
- AHNE, W., (1982): Vergleichende Untersuchungen über die Stabilität von vier fischpathogenen Viren. Zbl. Vet. Med. B 29, 457-476.
- AHNE, W., (1983a): Zur Verbreitung von Fischviren durch belebte und unbelebte Vektoren. Fortschr. Vet. Med. 37, 128-131.
- AHNE, W. (1983b): Presence of infectious pancreatic necrosis virus in the seminal fluid of rainbow trout (Salmo gairdneri Rich.). J. Fish. Dis. 6, 377.

- AHNE, W. (1985): Virusinfektionen bei Fischen: Ätiologie, Diagnose und Bekämpfung.
Zbl. Vet. Med. B, 32, 237-264.
- AHNE, W., and R.D. NEGELE (1985): Studies on the transmission of IPN virus via eyed eggs and sexual products of salmonid fishes. In: Fish and Shellfish pathology ed. A.E. ELLIS, pp. 261-269, Academic Press London.
- AHNE, W., und K. WOLF (1980) Viruserkrankungen der Fische.
In: Krankheiten und Schädigungen der Fische pp. 56-105. H.H. Reichenbach-Klinke ed. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- ALEMEIDA, J.D. and A.P. WATERSON (1964): The morphology of virus-antibody interaction.
Adv. Virus Res. 15, 307-338.
- ARCHETTI and HORSFALL (1950): Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in vivo with heterolous immune serum.
J. Exp. Med. 92, 441-462.
- ASHE, W.K. and A.L. NOTKINS (1967): Kinetics of sensitization of herpes simplex virus and its relationship to the reduction in the neutralization rate constant.
Virology 33, 616-617.
- BILLY, J.L. and K. WOLF (1969): Quantitive comparison of peritoneal washes and feces for detecting infectious pancreatic necrosis (IPN) virus in carrier brook trout.
J. Fish Res. Board. Can. 26, 1459-1465.
- BONIN, O. (1973): Quantitativ-virologische Methodik.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- BOVO, G., G. GIORGETTI and G. CESCHIA (1985): Comparative sensitivity of five fish cell lines to wild infectious pancreatic necrosis virus isolated in northeastern Italy.
Fish and Shellfish pathology, 29, 289-293.
- BULLOCK, G.L., R.R. RUCKER, D. AMEND, K. WOLF and M. STUCKEY (1976): Infectious pancreatic necrosis: transmission with iodinetreated and nontreated eggs of brook trout (Salvelinus fontinalis).
J. Fish Res. Board. Can. 33, 1197-1198.
- CHANG, N., R.D. MacDONALD and T. YAMAMOTO (1977): Purification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and comparison of polypeptide composition of different isolates.
Can. J. Microbiol. 24, 19-27.

- CLERX, J.M., M.M.C. HORZINEK and A.D.M.E. OSTERHAUS (1978): Neutralization and enhancement of infectivity of non-salmonid fish rhabdoviruses by rabbit and pike immune sera.
J. Gen. Virol. 40, 297-308.
- COHEN, J. and R. SCHERRER (1974): Le virus de la Nécrose pancréatique infectieuse. I. Purification et structure de la capside.
Ann. Rech. Vét. 5 (I), 87-100.
- CUCHENS, M.A. and L.W. CLEM (1977): Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. II. Differential effects of temperature on fish T-like and B-like cells.
Cell. Immunology, 34, 219.
- DANGSCHAT, H. und C. PFEIL-PUTZIEN (1978): Zur Verbreitung der Infektiösen Pankreasnekrose.
Fischwirt 28, 21-22.
- DOBOS, P., B.J. HILL, R. HALLET, D. KELLS, H. BECHT and D. TENINGES (1979): Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes.
J. Virol. 32, 593-605.
- DORSON, M. (1977a): Infectious pancreatic necrosis of salmonidae. Recent developments and future prospects.
Vet. Sci. Commun. 1, 201-212.
- DORSON, M. (1977b): Vaccination trials of rainbow trout fry against infectious pancreatic necrosis.
Bull. Off. Int. Epiz. 87, 405-406.
- DORSON, M. (1981): Role and characterization of fish antibody.
International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and vaccines, Leetown, W. Va., U.S.A. 1981, Develop. biol. Standard. 49, pp. 307-319 (S. Karger, Basel 1981).
- DORSON, M. (1984): Applied immunology of fish.
In: Proceedings Symposium on Fish Vaccination, O.I.E. Paris pp. 39-75.
- DORSON, M., J. CASTRIC and C. TORCHY (1978): Infectious pancreatic necrosis virus of salmonids: biological and antigenic features of a pathogenic strain and of a non-pathogenic variant selected in RTG-2 cells.
J. Fish Dis. 1, 309-320.
- DORSON, M. et P. DeKINKELIN (1974): Nécrose pancréatique infectieuse des salmonidés: enquête sérologique dans les population domestique et sauvages.
Ann. Rech. Vét. 5 (2), 249-256.

- DORSON, M. and C. TORCHY (1979): Complement dependant neutralisation of Egtved virus by trout antibodies.
J. Fish Dis. 2, 345-347.
- DORSON, M. and C. TORCHY (1981): The influence of fish age and water temperature on mortalities of rainbow trout (Salmo gairdneri Richardson) caused by a european strain of infectious pancreatic necrosis virus.
J. Fish Dis. 4, 213-221.
- DORSON, M. and C. TORCHY (1985): Experimental transmission of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus via the sexual products.
In: Fish and Shellfish Pathology ed. A.E. Ellis, pp. 251-260, Academic Press London.
- DORSON, M., P. DeKINKELIN and C. TORCHY (1975): Virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse: Acquisition de la sensibilité au facteur neutralisant du sérum de truite après passages successifs en culture cellulaire.
C.R. Acad. Sc. Paris, 281, 1435-1438.
- ELLIS, A.E. (1977): Ontogeny of the immune response in Salmo salar. Histogenesis of the lymphoid organs and appearance of membran immunoglobulin and mixed leucocyte reaction.
In: Development Immunobiology (J.B. Solomon and J.D. Horten eds.), 225, Elsevier/North Holland Biochemical Press, Amsterdam.
- ELLIS, A.E. and H.-J. SCHLOTFELDT (1985): Immunologie der Knochenfische.
In: Grundlagen der Fischpathologie, p.p. 98-111, R.J. Roberts/H.-J. Schlotfeld, Verlag Paul Parey; Berlin-Hamburg.
- ESPMARK, J.A., M. GRANDIEN and N.R. BERGQUIST (1971): Quantitive evaluation of direct and indirect immunofluorescence tests for viral antigen.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 177, 98.
- FIJAN, N., D. SULIMANOVIC, M. BEARZOTTI, D. MUZINIC, L.O. ZWILLENBERG, S. CHILMONCZYK, J.F. VAUTHEROT and P. DeKINKELIN (1983): Some properties of the Epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp (Cyprinus carpio).
Ann. Virol. (Inst. Pasteur) 134 E, 207-220.
- FRANTSI, C. and M. SAVAN (1971a): Infectious pancreatic necrosis virus: comparative frequencies of isolation from feces and organs of brook trout (Salvelinus fontinalis).
J. Fish Res. Board. Can., 28, 1064-1065.
- FRANTSI, C., and M. SAVAN (1971b): Infectious pancreatic necrosis virus - temperature and age factors in mortality.
J. Wildlife Dis. 7, 249-255.
- GRAVELL, M. and R.G. MALSBERGER (1965): A permanent cell line form the fathead minnow (Pimephales promelas).
Ann. N.Y. Acad. Sci. 126, 555-565.

- HEDRICK, R.P., J.C. LEONG and J.L. FREYER (1978): Persistent infections in salmonid fish cells with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *J. Fish Dis.*, 1, 297-308.
- HILL, B.J. (1976): Properties of a virus isolated from bivalve mollusc Tellina tenuis (da Costa). In: *Wildlife Diseases* (Ed. L.A. Page), p.p. 445-452, Plenum Press, New York and London.
- HILL, B.J. (1982): Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. In: *Spec. Publ. Soc. Gen. Microbiol.* Academic Press, 91-114.
- HILL, B.J. and P.F. DIXON (1977): Studies on IPN virulence and immunization. *Bull. Off. Int. Epiz.* 87, 425-427.
- HILL, B.J., M. DORSON and P.F. DIXON (1980): Studies on immunization of trout against IPN. In: *Fish Disease*, AHNE, W. ed. pp. 29-36. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- HORZINECK, M.C. (1973): Comparative aspects of togaviruses. *J. Gen. Virol.* 20, 87-103.
- JØRGENSEN, P.E.V. (1973): The nature and biological activity of IPNV virus neutralizing antibodies in normal and immunized rainbow trout (Salmo gairdneri). *Arch. Ges. Virusforsch.* 42, 9-20.
- JØRGENSEN, P.E.V. (1974a): A study of viral diseases in Danish rainbow trout, their diagnosis and control. A/s Carl. F. Mortensen, Bulowsvej 5C, 1870 København V.
- JØRGENSEN, P.E.V. (1974b): Indirekt fluorescent antibody techniques for demonstration of trout viruses and corresponding antibody. *Acta Vet. Scand.* 15, 198-205.
- JØRGENSEN, P.E.V. and F. BRENGBALLE (1969): Infectious pancreatic necrosis in rainbow trout (Salmo gairdneri) in Denmark. *Nord. Vet. Med.* 21, 142-148.
- JØRGENSEN, P.E.V. und C. GRAUBALLE (1971): Problems in the serological typing of IPN virus. *Acta Vet. Scand.* 12, 145-147.
- JØRGENSEN, P.E.V. and N.P. KEHLET (1971): Infectious pancreatic necrosis (IPN) viruses in Danish rainbow trout. *Nord. Vet.-Med.* 23, 568-575.
- KÄRBER, G. (1931): Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* 162, 480.

- KELLY, R.K. and O. NIELSEN (1985): Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus by serum from normal rainbow trout (Salmo gairdneri) in Canadian hatcheries.
Fish Pathology, 19 (4), 245-251.
- KINKELIN de, P., H.J. BERNARD and A.M. HATTENBERGER-BAUDOUY (1984): Immunization against viral diseases occurring in cold water.
In: Proceedings Symposium on Fish Vaccination, O.I.E. Paris pp. 167-197.
- LIENTZ, J.C. and SPRINGER, J.E. (1973): Neutralization tests on infectious pancreatic necrosis virus with polyvalent antiserum.
J. Wildlife Dis. 9, 120-124.
- IJUNGBERG, O. and P.E.V. JØRGENSEN (1972): Infectious pancreatic necrosis in Swedish fish farms.
EIFAC 72/SC II - Symposium 14.
- MacDONALD, R.D. and T. YAMAMOTO (1978): Quantitative analysis of defective interfering particles in infectious pancreatic necrosis virus preparations.
Arch. Virol. 57, 77-89.
- MacDONALD, R.D., A.R. MOORE and B.W. SOUTER (1983): Three new serotypes of infectious pancreatic necrosis virus isolated in Canada.
Can. J. Microbiol. 29, 137-141.
- MacMICHEL, J., J.L. FRYER and K.S. PILCHER (1975): An antigenic comparison of three strains of infectious pancreatic necrosis virus of salmonid fishes.
Aquaculture, 6, 203-210.
- MAISSE, G. et M. DORSON (1976): Production d'agglutinines anti Aeromonas salmonicida par la truite arc-en-ciel. Influence de la température, d'un adjuvant et d'un immunodepresseur.
Ann. Rech. Vét. 7, 307-313.
- MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK, G. WITTMANN (1977): Virologische Arbeitsmethoden; Band II.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- MUNRO, A.L.S. and I. B. DUNCAN (1977): Current problems in the study of the biology of infectious pancreatic necrosis virus and the management of the disease it causes in cultivated salmonid fish.
In: Aquatic microbiology, eds. F.A. Skinner and J.M. Shewan, pp. 325-337. Academic Press, London.
- NICHOLSON, B.L. and S. POCHEBIT (1981): Antigenic analysis of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by neutralization kinetics.
International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and vaccines, Leetown, W. Va., U.S.A. 1981, Develop. biol. Standard 49, pp. 35-41 (S. Karger, Basel 1981).

- RENO, P.W., S. DARLEY and M. SAVAN (1978): Infectious pancreatic necrosis: experimental induction of the carrier state in trout.
J. Fish Res. Board. Can. 35, 1451-1456.
- ROBERTS, I.E. and P. DOBOS (1983): Studies on the mechanism of temperature sensitivity of infectious pancreatic necrosis virus replication.
J. Gen. Virol., 64, 331-339.
- ROBERTS, R.J. and I.J. McKNIGHT (1976): The pathology of infectious pancreatic necrosis. II. Stress-mediated recurrence.
Brit. Vet. J. 132, 209-213.
- SAVAN, M. and P. DOBOS (1980): Effekt of virazole on rainbow trout Salmo gairdneri Richardson fry infected with infectious pancreatic necrosis virus.
J. Fish Dis. 3 (5), 437-440.
- SCHERRER, R. and J. COHEN (1974): Studies on infectious pancreatic necrosis virus interactions with RTG-2 and FHM cells: Selection of a variant virus type in FHM-cells.
J. Gen. Virol. 28, 9-20.
- SCHLOTTFELDT, H.J. (1979): Die infektiöse Pankreasnekrose (IPN) der Salmoniden; Teil I: Ätiologie, Epizootiologie und Bekämpfung.
Tierärztl. Umschau 34, 539-546.
- SONSTEGARD, R.A. and L.A. McDERMOTT (1972): Epidemiological model for passive transfer of IPNV by homeotherms.
Nature, 237, 104-105.
- SWANSON, R.N. (1981): Use of the indirect fluorescent antibody test to study the pathogenesis of infectious pancreatic necrosis virus infection in trout.
International Symposium on Fish Biology, Serodiagnostics and vaccines Leetown, W. Va., USA 1981, Develop. biol. Standard, 49, 71-77.
- SWANSON, R.N. and J.H. GILLESPIE (1981): An indirect fluorescent antibody test for the rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus in tissues.
J. Fish Dis. 4, 309-315.
- UNDERWOOD, B.O., C.Y. SMALE, J. BROWN and B.Y. HILL (1977): Relationship of a virus from Tellina tenuis to infectious pancreatic necrosis virus.
J. Gen. Virol. 36, 93-109.
- WIZIGMANN, G., W. AHNE und H.-J. SCHLOTTFELDT (1983a): Laboratoriumsdiagnose von Virusinfektionen bei Süßwasserfischen unter besonderer Berücksichtigung der viralen hämorrhagischen Septikämie (VHS), der infektiösen Pankreasnekrose (IPN) und der Frühlingsvirämie (SVCV).
Tierärztl. Umschau, 38, 44-49; 129-131 und 197-200.

- WIZIGMANN, G., H. DANGSCHAT, CH. BAATH und C. PFEIL-Putzien (1983b): Untersuchungen über Virusinfektionen bei Süßwasserfischen in Bayern. Tierärztl. Umschau, 38, 250-258.
- WOLF, K. and QUIMBY (1962): Established eurythermic line of fish cells in vitro. Science, 135, 1065-1066.
- WOLF, K. and QUIMBY (1966): Lymphocystis virus: Isolation and propagation in centrarchid fish cell lines. Science 151, 1004-1005.
- WOLF, K. and QUIMBY (1967): Infectious pancreatic necrosis: Its diagnosis, identification, detection and control. Riv. It. Piscic. ittiopat., 2 (4), 76-80.
- WOLF, K. and QUIMBY (1969): Infectious pancreatic necrosis: Clinical and immune response of adult trout to inoculation with live virus. J. Fish Res. Board. Can. 26, 2511-2516.
- WOLF, K. and QUIMBY (1971): Salmonid Viruses: Infectious pancreatic necrosis virus. Morphology, pathology and serology of the first European isolations. Arch. Virol. 34, 144-156.
- WOLF, K., M.C. QUIMBY and A.D. BRADFORD (1963): Eggassociated transmission of IPNV virus and trouts. Virology, 21, 317-321.
- WOLF, K., S.P. SNIESZKO, C.E. DUNBAR and E. PYLE (1960): Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. Proc. Soc. Exp. Biol. 104, 105-108.
- WOOD, E.M., S.F. SNIESZKO and W.T. YASUTAKE (1955): Infectious pancreatic necrosis in brook trout. A.M.A. Arch. Path. 60, 26-26.
- YAMAMOTO, T. (1974): Infectious pancreatic necrosis virus occurrence at a hatchery in Alberta. J. Fish Res. Board Can. 31, 397-402.
- YAMAMOTO, T. (1975a): Frequency of detection and survival of infectious pancreatic necrosis virus in a carrier population of brook trout (Salvelinus fontinalis) in a lake. J. Fish Res. Board. Can. 32, 568-570.
- YAMAMOTO, T. (1975b): Infectious pancreatic necrosis (IPN) virus carriers and antibody production in a population of rainbow trout (Salmo gairdneri). Can. J. Microbiol. 21, 1343-1347.

- YAMAMOTO, T. and J. KILISTOFF (1979): Infectious pancreatic necrosis virus: quantification of carriers in lake populations during a six year period.
J. Fish Res. Board. Can. 36, 562-567.
- YU, K.K.-Y., R.D. MacDONALD and A.R. MOORE (1982): Replication of infectious pancreatic necrosis virus in trout leucocytes and detection of the carrier state.
J. Fish Dis. 5, 401-410.

Mein Dank gilt allen, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Besonderen Dank schulde ich
Herrn Prof. Dr. W. Ahne für die Überlassung
des Themas, die wissenschaftliche Anleitung
sowie die vorbildliche Betreuung.

Frau I. Thomsen danke ich für die allzeit
gute Zusammenarbeit und die Hilfeleistung
bei der Durchführung der Versuche.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden von
dem Bundesministerium für Ernährung,
Landwirtschaft und Foresten freundlicher-
weise finanziell unterstützt.

LEBENS LAUF

von

Gottfried Adolf Heinrich Kohlmeyer

Am 3. November 1956 wurde ich als erstes von vier Kindern des Gymnasiallehrers Waldemar Kohlmeyer und seiner Ehefrau Klotilde, geb. Kaepfel, in Dinkelsbühl geboren.

1963 - 1967:	Grundschule in Dinkelsbühl
1967 - 1976:	Gymnasium in Dinkelsbühl
1976 - 1977:	Grundwehrdienst
1977 - 1983:	Studium der Tiermedizin an der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
07. Juni 1983:	Staatsexamen
21. Juli 1983:	Approbation als Tierarzt
August 1983 :	Beginn der vorliegenden Doktorarbeit
November 1983	Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut
bis Juni 1985:	für Zoologie und Hydrobiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

